

ZYG MUNT CYGAN, LESZEK MORAWSKI

# Badania nad występowaniem ciepłoopornych laseczek *Cl. perfringens* A w ziemi oraz w kale zwierząt zdrowych

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Beztlenowce tzw. grupy *Cl. perfringens* występują w przyrodzie jako szczepy wytwarzające przetrwalniki ciepłooporne i ciepłowrażliwe. Znaczenie tych drobnoustrojów w patologii człowieka i zwierząt wiąże się przede wszystkim z wywoływaniem enterotoksemii (3, 6, 8, 13, 15, 16, 24, 26, 29), zakażeń przyranych (10, 21, 32, 33) oraz zatruc pokarmowych (17, 18, 19). Enterotoksemie i zakażenia przyranne stanowią schorzenia związane z działaniem laseczek ciepłowrażliwych. Natomiast zatrucia pokarmowe na tle *Cl. perfringens* A, bardzo częste u człowieka, a niekiedy występujące również u zwierząt, są najczęściej wywoływane przez enterotoksynogenne szczepy ciepłooporne (18, 19), rzadziej przez ciepłowrażliwe (17, 25). Znaczenie głównie epidemiologiczne tych schorzeń wynika między innymi z rozpowszechnienia zarazka w 2 podstawowych biotopach, tj. w ziemi (4, 21, 39) oraz w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt (22, 23, 30, 31, 34, 36, 38). Ponadto jest ono określone całokształtem warunków wytwarzania i przechowywania środków spożywczych (18, 19, 40). Co do opisanych przez Zeisslera i Rassfeld-Sternberg (40) oraz Egertona i Walkera (11) zatruc pokarmowych, powodowanych przez *Cl. perfringens* C, to występują one tylko sporadycznie.

Stopień rozpowszechnienia laseczek *Cl. perfringens* w ziemi oraz w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt był szeroko badany na całym świecie (4, 21, 22, 23, 30, 31, 34, 36, 39), a także w Polsce (5, 22). Jednak badań takich w odniesieniu do szczepów ciepłoopornych tego gatunku beztlenowca było stosunkowo niewiele, a w przypadku kraju — całkowity brak.

W związku z powyższym niniejszą pracę własną ukierunkowano na określenie częstotliwości występowania ciepłoopornych drobnoustrojów *Cl. perfringens* A w ziemi oraz w kale zwierząt zdrowych z terenu województwa „L”.

## Materiał i metody

1. **Badany materiał.** Ogółem badaniu poddano 132 próby ziemi pobranej z głębokości około 15 cm, w tym ziemi uprawnej — 77 prób oraz leśnej — 55, a ponadto 297 prób kału od zwierząt, a mianowicie od bydła — 120, świń — 100, owiec 21 i kur — 56.

2. **Izolacja.** Próbkę ziemi i kału namnażano w ilości około 1 g w podłożu Wrzoska przez 24 godz. w 37°C. W ten sposób uzyskane hodowle przesiewano na podłożu Zeisslera z neomycyną (9) i przez 24 godz.

inkubowano w 37°C w warunkach beztlenowych metodą pyrogallolową wg Pestiego (27). Charakterystyczne dla ciepłoopornych laseczek *Cl. perfringens* kolonie z hemolizą typu alfa namnażano w podłożu Wrzoska, a potem w warunkach tlenowych sprawdzano na ewentualne zanieczyszczenia tlenowcami — przez wysiew na podłożu agarowe z krwią.

3. **Identyfikacja.** Przy ustalaniu gatunku wyosobnionego beztlenowca sprawdzano właściwości morfologiczne komórki bakteryjnej i kolonii oraz zdolność fermentowania laktozy, glukozy, sacharozy, maltozy, mannitu, salicyny i eskuliny. Ponadto określano także cechy proteolityczne zarazka w odniesieniu do 15% żelatyny, ściętej surowicy końskiej (80°C — 1 godz.) i mleka lakmusowego oraz zdolność redukcji azotanów i wytwarzania indolu. Identyfikację typu *Cl. perfringens* przeprowadzano odczynem seroneutralizacji na albinotycznych świnkach morskich — przy zastosowaniu toksyn otrzymanych w pożywce wg Prevot i Boorsma (28) oraz wzorcowych surowic diaagnostycznych anty *Cl. perfringens* produkcji Wellcome Reagents Limited (Anglia).

4. **Ciepłooporność zarazka.** Wyosobnione szczepy *Cl. perfringens*, wytwarzające hemolizę tylko typu alfa, wysiewano na podłożu Ellnera (12) inkubowane przez 48—72 godz. w 37°C. Następnie z uzyskanych hodowli sporządzano preparaty barwione metodą Schaeffera — Fultona dla wykazania przetrwalników. Wszystkie kultury zawierające przetrwalniki ogrzewano przez 1 godz. w 100°C, po czym sprawdzano ich żywotność przez wysiew na podłożu Wrzoska z 0,2% NaHCO<sub>3</sub>. Okres obserwacji w tych podłożach w 37°C wynosił 7 dni. Za ciepłooporne uznawano szczepy, które przeżywały 1 godzinne ogrzewanie w 100°C.

## Wyniki

W przeprowadzonych badaniach wyosobniono ogółem 45 szczepów ciepłoopornych, które zarezerwowano na podstawie właściwości morfologicznych, hodowlanych i biochemicznych do grupy laseczek *Cl. perfringens*. Odczynem seroneutralizacji wszystkie szczepy sklasyfikowano do serotypu A, z tym, że 32 szczepy były toksynogenne, a 13 — słabo toksyczne. Pod względem morfologicznym przedstawiały się one jako laseczki gramododatnie, tworząc na podłożu Zeisslera kolonie gładkie i szorstkie wielkości — 3—4 mm. Powyższe drobnoustroje cechowała aktywność fermentacyjna w stosunku do laktozy, glukozy, sacharozy, maltozy, oraz niekiedy salicyny (5 szczepów). Natomiast żaden ze szczepów nie fermentował mannitu i eskuliny oraz nie produkował indolu. Wszystkie zarazki koagulowały mleko lakmusem z powstaniem gąbczastego skrzepu ściętej kazeiny, redukowały azotany, słabo rozpuszczały ściętą surowicę końską, a wiele z nich rozrzedzało 15% żelatynę (27 szczepów).

Wyniki badań nad częstotliwością wyosabniania ciepłopornych beztlenowców *Cl. perfringens* A z ziemi oraz z kału zwierząt zestawiono w tab. 1. Wynika z niej, że na 429 zbitych materiałów, wynik dodatni izolacji uzyskano z 45 prób (10,5%), co wyniosło w przypadku ziemi — 5,3%, a kału zwierząt — 12,8%.

Tab. 1. Częstotliwość występowania ciepłopornych szczepów *Cl. perfringens* A w ziemi oraz w kale zwierząt zdrowych

Pochodzenie prób	W y n i k		
	Ilość prób		Ilość wyosabnionych szczepów
	ogółem	z wynikiem dodatnim	
Ziemia uprawna	77	7 (9,1%)	7
„ leśna	55	0 (0%)	0
Kał świń	100	18 (18%)	18
„ kur	56	10 (17,9%)	10
„ owiec	21	2 (9,5%)	2
„ krów	120	8 (6,7%)	8
Razem	429	45 (10,5%)	45

Najczęściej przy tym badane beztlenowce izolowano z kału świń — 18% i kur — 17,9%, a następnie owiec — 9,5% oraz krów — 6,7%. Odnosnie ziemi — to ciepłoporne laseczki *Cl. perfringens* A stwierdzono jedynie w 7 próbach z pól uprawnych na 77 zbitych (9,1%), podczas gdy nigdy nie były wykazane w ziemi leśnej (ogółem 55 prób zbitych).

### Dyskusja

Głównymi rezerwuarami beztlenowców rodzaju *Clostridium* w przyrodzie są ziemia (4, 20, 21, 25) oraz przewód pokarmowy człowieka i zwierząt (22, 23, 30, 31, 34, 35, 38), gdzie występują one prawie w 100% badanych prób (4, 21, 22). Spośród tych drobnoustrojów najczęściej spotyka się laseczki *Cl. perfringens* A wytwarzające przetrwalniki ciepłowrażliwe (17, 35), a o wiele rzadziej — ciepłoporne (18, 19). Niniejsze badania własne, przeprowadzone w odniesieniu do bakterii ciepłopornych *Cl. perfringens* A, potwierdziły w pełni to stwierdzenie, wykazując przy tym, że rozmieszczenie zarazka w ziemi jest różne zależnie od miejsca pochodzenia próbek. Wskaźnik izolacji tych beztlenowców wyniósł bowiem dla próbek z pól uprawnych — 9,1%, a dla ziemi z lasu — 0%. Wynik ten odpowiada danym MacLennana (21), wskazującym na częstsze występowanie zarazka w ziemiach uprawnych, niż nieuprawnych — pustynnych. Ponadto osiągnięty rezultat jest bardzo zbliżony do uzyskanego w pracy Wijewanty (39) wskaźnika, wynoszącego — 7,4%.

Odnosnie rozpowszechnienia ciepłopornych drobnoustrojów *Cl. perfringens* A w kale zwierząt, to otrzymane wyniki badań własnych ustaliły, że odnośnie zarazki najczęściej stwierdza

się u świń (18%). W 1953 r. Hobbs i wsp. (19) podali, że w Anglii bardzo częstym nosicielem tych laseczek jest również świnia (w 18,4%). Podobny pogląd wyraża Shigemi (30) w Japonii, wykazując dużą rolę tego zwierzęcia jako rezerwuaru zarazka. Ponadto z danych innych autorów wynika, że oprócz świń bardzo często nosicielami tych beztlenowców są także psy i koty (7) oraz myszy i szczury (19), a także człowiek (1, 2, 14), gdzie występują one w znacznych ilościach, dochodząc do 10<sup>9</sup>/g zawartości jelit.

W omawianej pracy własnej zasługuje też na uwagę stwierdzone nosicielstwo ciepłopornych laseczek *Cl. perfringens* u 18% zbitych kur. Wynik ten odbiega od wskaźnika nosicielstwa, który w badaniach Shigemi (30) wyniósł 3,6%. Być może, powyższe odchylenie wynika z różnic w sposobie żywienia ptaków. Podkreślić należy, że rozprzestrzenienie zarazka w kale kur może mieć znaczenie epidemiologiczne, gdyż jak wykazali Tsai i wsp. (37) około 60% szczepów *Cl. perfringens* A pochodzących od tych ptaków posiada właściwości enerotoksynogenne.

Co do wyników badań własnych, dotyczących kału od przeżuwaczy tj. owiec i krów, to występowanie tych beztlenowców było najrzadsze (9,5% i 6,7%) i odpowiadało ogólnie danym innych autorów (19, 30).

Reasumując należy stwierdzić, że kał szeregu gatunków zwierząt, a zwłaszcza świń i kur a ponadto ziemia uprawna — stanowią główne nisze ekologiczne dla ciepłopornych laseczek *Cl. perfringens* A, które są uznane za najczęstszy czynnik etiologiczny beztlenowcowych zatruc pokarmowych człowieka.

### Piśmiennictwo

- Akama K., Otani S.: Jap. J. med. Sci. Biol. 23, 161, 1970.
- Barnes E. M., Despaul J. E., Ingram M.: J. appl. Bact. 26, 415, 1963.
- Barnes D. M., Moon H. W.: J. Am. vet. med. Ass. 144, 1391, 1964.
- Bessemans A., Monteny V.: C. r. hebdom. Seanc. Acad. Sci., Paryż 127, 361, 1938.
- Blawat F., Chyliński G., Aftanas A.: Lekarz Wojskowy 35, 759, 1959.
- Brill J., Meisel H., Rymkiewicz D.: XIII Zjazd Mikrobiologów Polskich, Poznań 1955.
- Bryan F. L.: J. Milk Food Tech. 32, 382, 1969.
- Bullen J. J.: J. Path. Bact. 64, 201, 1952.
- Cygan Z.: Clostridia w narządach zwierząt zdrowych i padłych, praca doktorska, Lublin 1967.
- Cygan Z., Wawrzekiewicz K.: Medycyna Wet. 9, 518, 1966.
- Egerton J. R., Walker P. D.: J. Path. Bact. 88, 275, 1964.
- Ellner P. D.: J. Bact. 71, 495, 1956.
- Field H. I., Gibson E. A.: Vet. Rec. 67, 31, 1955.
- Genigeorgis C.: J. Am. vet. med. Ass. 167, 821, 1975.
- Griner L. A.: Bull. Off. int. Epizoot. 59, 1443, 1963.
- Griner L. A., Johnson H. W.: J. Am. vet. med. Ass. 125, 125, 1954.
- Hall H. E., Angelotti R., Lewis K. H., Foter M. J.: J. Bact. 85, 1094, 1963.
- Hobbs B. C.: J. appl. Bact. 28, 74, 1965.
- Hobbs B. C., Smith M. E., Oakley C. L., Warrack G. H., Cruickshank J. C.: J. Hyg., Camb. 51, 75, 1953.
- Jastrzębski T., Cygan Z., Nowak J.: Medycyna Wet. 24, 516, 1968.
- MacLennan J. D.: Bact. Rev. 26, 177, 1962.
- Meisel H., Trembowler P., Pogorzelska B.: Med. dośw. 1, 31, 1966.
- Narayan C. G.: Acta vet. hung. 16, 65, 1966.
- Nilakantan P. R., Kathuria B. K.: Indian vet. J. 28, 197, 1959.
- Nishida S., Nakagawara G.: J. Bact. 88, 1636, 1964.
- Parish W. E.: J. comp. Path. 71, 337, 1961.
- Pesti L.: Acta vet. hung. 15, 447, 1965.
- Prevot A. R., Boersma A.: cyt. wg poz. 9.
- Saliński T. B.: Vet. Glasn. 6, 464, 1932.



30. Shigemi O.: J. vet. Res. 14, 131, 1966.  
 31. Sidorenko G. I.: Z. Mikrobiol. Epidem. Immunobiol. 11, 29, 1965.  
 32. Smith L. DS., George R. L.: J. Bact. 51, 271, 1946.  
 33. Stock A. H.: J. Bact. 54, 169, 1947.  
 34. Sutton R. G. A.: J. Hyg., Camb. 64, 65, 1966.  
 35. Sutton R. G. A., Hobbs B. C.: J. Hyg., Camb. 135, 1963.  
 36. Taylor A. W., Gordon W. S.: J. Path. Bact. 50, 271, 1940.  
 37. Tsai C., Torres — Anjel M. J., Riemann H. P.: J. Form. med. Ass. 73, 501, 1974.  
 38. Turner G. C., Wong — Ming — Ming M. M. W.: J. Path. Bact. 82, 529, 1961.  
 39. Wijewanta E. A.: J. Path. Bact. 88, 339, 1964.  
 40. Zeissler J., Rassfeld — Sternberg L.: Br. med. J. 12, 267, 1949.

Adres autora: doc. dr habil. Zygmunt Cygan, ul. Słowicza 2/7, 20-336 Lublin.

Цыган З., Моравски Л. — Присутствие теплоустойчивых палочек *Cl. perfringens A* в земле и в кале здоровых животных.

Бактериологическому исследованию подвергли 132 образца возделываемых и лесных почв и 297 проб кала коров, свиней, овец и кур. Теплоустойчивые анаэробы *Cl. perfringens A* установили в пробах

земли в 5,3% (в образцах возделываемой земли в 9,1%, в земле из под леса — 0%), а в пробах кала в 12,8% (свиней — 18%, кур — 17,9%, овец — 9,5%, коров — 6,7%). Все изолированные штаммы исследовали морфологически, на посевах и биохимически.

Cygan Z., Morawski L. — Investigations on the occurrence of thermoresistant *Cl. perfringens A* bacilli in the soil and stools of normal animals.

The examinations concerned the frequency of the occurrence of *Cl. perfringens A* in the soil and stools of normal animals. One hundred and thirty two samples of soil (cultivated and also taken from the forest) and 297 samples of faeces of cows, pigs, sheep and hens were examined. *Cl. perfringens A* was found in the soil in 5.3% (9.1% from cultivated soil and 0% from the forest) in the stools of pigs in 18%, hens in 17.9%, sheep in 9.5% and cows in 6.7%. All the isolated bacteria were examined taking into consideration their morphology, cultivation and biochemical properties.

MARIAN JELIŃSKI, RYSZARD KOSTECKI, MARIA SŁUŻEWSKA

## Aktywność lipolityczna *Bacillus larvae* White

Z Zakładu Mikrobiologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Z Zakładu Badania Chorób Owadów Użytkowych Instytutu Weterynarii w Swarzędzu

Rola, jaką odgrywa *Bac. larvae* jako czynnik patogenny u pszczół, stanowiąc jedyną przyczynę zgnilca złośliwego u czerwia, znana jest od dawna. Właściwości lipolityczne tej laseczki są jednak na ogół mało rozpracowane.

Lipaza należąca do hydrolaz estrów karboksylowych, jest enzymem katalizującym hydrolizę tłuszczowców z przyłączeniem wody (2), uwalniając przy tym kwasy tłuszczowe. Metody pozwalające na wykrywanie tego enzymu stosowano zarówno u laseczek tlenowych jak i beztlenowych (3, 4), oznaczając aktywność i badając szybkość reakcji na podłożach zawierających tłuszcze i substancje tłuszczowe (np. podłoże Willis-Hobbs).

Znaczny postęp w badaniach właściwości lipolitycznych nastąpił dzięki zastosowaniu Tween'ów — substancji, które są poliestrami sorbitolu i kwasu palmitynowego (Tween 40), stearynowego (Tween 60) i oleinowego (Tween 80). Stosując Tween'y można oznaczyć lipazy w badanym materiale bakteryjnym na podłożu Sierra, w którym dzięki zawartości chlorku wapnia kwasy tłuszczowe uwolnione przez lipazę tworzą nierozpuszczalne sole precypitujące w formie kryształów o morfologii specyficznej dla każdej z tych soli. Kryształy tworzą wokół kolonii aureolę widoczną makroskopowo. Każdy rodzaj bakterii lipolitycznych posiada specyficzność enzymatyczną, pozwalającą na atakowanie jednego lub kilku Tween'ów.

Ta dość prosta technika, którą Sebald i Prévot (4) zastosowali z powodzeniem w badaniach laseczek beztlenowych, pozwoliło na zastosowanie jej w określeniu właściwości lipolitycznych *Bac. larvae*, co stanowiło cel pracy.

Upřednio wykonano badania stwierdzające właściwości lipolityczne tych drobnoustrojów na zmodyfikowanym podłożu Willis-Hobbs (1), zastosowanie podłoża z Tween'ami miało by zatem na celu potwierdzenie tych badań.

### Materiał i metody

Szczepy bakteryjne. Do badań użyto 40 szczepów *Bac. larvae*, wyizolowanych z czerwia chorego na zgnilec złośliwy, pochodzących z byłego woj. poznańskiego i częściowo z byłego woj. krakowskiego. Szczep wzorcowy stanowił szczep B-3650 otrzymany od prof. T. A. Gochnauera z Kanady\*).

Podłoża i technika. Do izolacji szczepów użyto zmodyfikowanego podłoża Willis-Hobbs (1). Podłoże to okazało się również przydatne do przechowywania szczepów na skosach. Ze skosów przesiewano szczepy na podłoże EA — Foster i wsp. 1950 (5). Szczepy dwukrotnie przepasazowane na podłożu EA, po uzyskaniu odpowiedniego wzrostu przesiewano na podłoże Sierra z dodatkiem Tween'ów — 40, 60 i 80 wg metody Sebald i Prévot (4). Wymienione podłoże sporządzano na peptonie Tryptose (Difco), rozlewano do probówek aglutynacyjnych w słupki i posiewano przez wkłucie (bez upředniej regeneracji) materiałem pobranym z podłoża EA. Inkubację przeprowadzono w temperaturze 35°C przez okres 10 dni. Rozkład Tween'ów kontrolowano obserwując tworzenie się białych kryształów soli wapniowych kwasów tłuszczowych wzdłuż linii wkłucia oraz rejestrowano stopień aktywności i czas występowania reakcji u poszczególnych szczepów *Bac. larvae*.

### Wyniki i omówienie

Wyniki badań aktywności lipolitycznych 40 badanych szczepów oraz szczepu wzorcowego *Bac. larvae* przedstawiono w tab. 1.

\*) Autorzy pragną wyrazić wdzięczność prof. T. A. Gochnauerowi za przesłane szczepy.