

Wpływ czynników fizykochemicznych na skuteczność działania bakteriocyn bakterii mlekowych na patogeny osadów pościekowych

ANNA LIGOCKA, ZBIGNIEW PALUSZAK, JANUSZ HERMANN*

Katedra Mikrobiologii, *Katedra Chemii Środowiska Wydziału Rolniczego ATR, ul. Bernardyńska 6/8, 85-029 Bydgoszcz

Ligocka A., Paluszak Z., Hermann J.

Influence of physical and chemical factors on the impact of lactic acid bacteria bacteriocin's on pathogens in sewage sludge

Summary

The aim of the research was to estimate the impact of temperature, pH and heavy metal ions on the effectiveness of the action of the bacteriocin of lactic acid bacteria on selected pathogenic bacteria. The experiment studied 12 bacteriocinogenic isolates of lactic acid bacteria from *Lactobacillus* genus coming from three different sources (collections of pure cultures, composted green materials, and EM preparation) and pathogenic bacteria – *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. The study showed that the tested lactic acid bacteria gave no evidence of bacteriocinogenic activity at 20°C, whereas in several cases a temperature of 37°C stimulated antagonistic activity of lactic acid bacteria. In most cases the investigated isolates of *Lactobacillus* did display an ability for bacteriocin synthesis in medium pH 5.5; 8.0 and 9.0. Neutral pH was the most optimal pH for bacteriocin production. The addition of metal ions Mg^{2+} and Mn^{7+} to the medium resulted in bacteria growth inhibition in most isolates. Only bacteria deriving from EM preparations were not susceptible to the influence of heavy metals, and it may be concluded that they should be introduced into biomass for its effective hygienization. Selected isolates of lactic acid bacteria can be used in mesophilic anaerobic processes of sewage sludge subjected to hygienization.

Keywords: lactic acid bacteria, bacteriocin

Właściwości enzymatyczne oraz antagonistyczne bakterii mlekowych mają duże znaczenie w skutecznej degradacji substancji organicznej w środowisku. Bakteriom z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* przypisuje się właściwości hamujące rozwój, między innymi, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Klebsiella* oraz drożdży *Candida albicans* (1, 2, 4, 6, 14, 16). Jednym z czynników odpowiedzialnych za właściwości antagonistyczne bakterii mlekowych są bakteriocyny, naturalne substancje antybiotyczne, które są białkami prostymi lub złożonymi, działającymi na strukturę błon komórkowych oraz syntezę DNA i białek. Najefektywniej produkowane są w warunkach beztlenowych. Te właściwości bakterii mlekowych mogą mieć ogromne znaczenie w przypadku utylizacji osadów pościekowych, prawie zawsze zawierających ogromny ładunek drobnoustrojów chorobotwórczych dla ludzi i zwierząt. Otrzymany produkt, o ile nastąpi pełna jego higienizacja, będzie mógł być wykorzystany do celów rolniczych jako polepszacz. Decydujący wpływ na jakość i ilość wytwarzanych bakteriocyn

mają warunki termiczne, większość tych substancji traci bowiem swoją aktywność w wysokiej temperaturze. Z kolei, przy niskim pH, a także w obecności jonów metali ciężkich produkcja bakteriocyn może zostać zahamowana (13, 15, 17). Optymalna temperatura dla wzrostu bakterii fermentacji mlekowej waha się w granicach od 30°C do 40°C, jednak optymalna temperatura dla produkcji bakteriocyn jest zwykle niższa. Wiele bakterii w temperaturach wyższych od temperatury optymalnej dla swojego wzrostu rośnie, ale ich nie produkuje (5, 22). Odczyn pożywki ma wpływ zwłaszcza na wydajność syntezy bakteriocyn oraz ich stabilność. Znaczenie ma tu pH, zarówno w początkowej, jak i końcowej fazie hodowli. Wysokie pH początkowe bulionów hodowlanych warunkuje efektywną biosyntezę większości bakteriocyn. W hodowli, której pH początkowe jest niższe niż 5,0, synteza bakteriocyn jest całkowicie zahamowana. Stwierdzono także, że wydajność biosyntezy tych białek podczas hodowli z kontrolowanym pH jest wyższa od uzyskiwanej w hodowli bez regulacji pH (13, 22). Szczypty bakteriocynogenne mogą być łatwo zidentyfikowane przez przeprowadzenie próby antagonistycznej, w któ-

rej kolonie przypuszczalnie produkujące te substancje tworzą strefy ograniczające wzrost szczepów wrażliwych.

Celem badań było określenie wpływu wybranych czynników fizykochemicznych (temperatura, pH, jony metali ciężkich) na skuteczność oddziaływania bakteriocyn bakterii mlekowych na patogeny w osadach pościekowych poddanych beztlenowym, mezofilnym procesom utylizacyjnym.

Material i metody

Badania przeprowadzono na 12 izolatach bakterii mlekowych, oznaczonych wcześniej jako bakteriocynogenne (12), które połączono w 3 odrębne grupy w zależności od źródła pochodzenia. Grupę I stanowiły szczepy *Lactobacillus brevis* 0845, 1975 i *L. plantarum* 0858, 1958 pochodzące z Kolekcji Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Grupę II – bakterie z rodzaju *Lactobacillus* oznaczone numerami 1, 2, 3, 16, 18 – wyizolowano z kompostowanego materiału zielonego. Grupę III – bakterie z rodzaju *Lactobacillus* oznaczone literami B, C, E, G otrzymano z preparatu EM (producent – firma Greenland, Puławy). Preparat EM (Effective Microorganisms) składa się z mieszaniny kultur pożytecznych, naturalnie występujących w przyrodzie mikroorganizmów, które używane w postaci szczepionek, powodują zwiększenie biologicznej różnorodności naturalnego środowiska (gleba, rośliny). EM zawiera wyselekcjonowane gatunki bakterii łącznie z bakteriami kwasu mlekowego (które są w tej mieszaninie gatunkiem dominującym) oraz drożdżami i niewielką ilością bakterii fotosyntetycznych, promieniowców oraz innych mikroorganizmów. Preparat EM jest również używany przy przerobieniu odpadów organicznych i w wielu podobnych zastosowaniach, mających na celu głównie ochronę środowiska.

Bakterie patogenne – *E. coli* i *S. enteritidis* pochodziły z kolekcji czystych kultur Bydgoskiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej. Hodowano je na wodzie peptonowej (Peptone Water, Merck, 7228) oraz na pożywce stałej TSA (Tryptone-Soja-Agar, P-0090, BTL Zakład Enzymów i Peptonów, Łódź).

Kontrolny układ doświadczenia wyglądał następująco: 18-godzinne hodowle bakterii mlekowych na płynnym podłożu MRS zaszczipiano punktowo na pożywkę MRS-agar (pH 6,4). Na pożywkę nanoszono po 5 µl 10-krotnego rozcieńczenia całodobowej hodowli bakterii w czterech miejscach oddalonych od siebie o około 3 cm. Hodowlę prowadzono w warunkach beztlenowych (Anaerocult, Merck) w ciągu 18-24 godzin w temperaturze 30°C. Warunki beztlenowe stworzono w celu zahamowania syntezy kwasu mlekowego oraz nadtlenu wodoru. Bakterie patogenne zaszczipiono na płynne podłoże (woda peptonowa) i inkubowano w 37°C przez 24 godziny. Następnie, zaszczipione punktowo hodowle bakterii mlekowych poddano działaniu chloroformu przez 20 minut. Miało to na celu uniemożliwienie wzrostu bakteriom w kolejnych etapach badań, które zachodziły w warunkach tlenowych. Po odparowaniu chloroformu (20 minut) pożywkę pokrywano zawiesiną bakterii patogennych (po 0,25 ml 10-krotnego rozcieńcze-

Tab. 1. Wpływ temperatury na produkcję bakteriocyn przez bakterie mlekowe (szerokość stref w mm).

Bakterie mlekowe	Grupa bakterii mlekowych	Patogeny	Kontrola (30°C)	Temperatura		
				20°C	37°C	
<i>L. plantarum</i>	I	<i>S. enteritidis</i>	3,5	0	5,0	
<i>L. brevis</i>			6,0	0	5,0	
1	II		2,0	0	0	
2			2,0	0	0	
3			2,0	0	0	
12			2,0	0	0	
18			2,0	0	0	
16			3,0	0	0	
B	III		<i>E. coli</i>	14,5	0	18,0
C				14,0	0	17,0
E				9,0	0	15,0
G				13,0	0	14,0

Objaśnienie: 0 – brak strefy zahamowania wzrostu

nia całodobowej hodowli) w 10 ml upłynnionej pożywki TSA. Hodowlę prowadzono w 30°C przez 48 godzin. Antagonistyczną aktywność bakterii mlekowych oceniano na podstawie pomiaru szerokości strefy zahamowania wzrostu bakterii chorobotwórczych.

W dalszej części badań określono wpływ warunków fizykochemicznych na aktywność bakteriocynogenną wybranych szczepów bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do warunków kontrolnych. Wpływ temperatury zbadano inkubując punktowo zaszczipione na pożywkę MRS bakterie mlekowe w 20°C i 37°C (kontrola – 30°C). Zmodyfikowano również pH pożywki MRS-agar, dodając do niej sterylne roztwory albo HCl, albo NaOH i doprowadzając jej odczyn do 5,5, 8,0 i 9,0 (kontrola – 6,8). Wpływ jonów metali ciężkich na właściwości bakteriocynogenne bakterii mlekowych prześledzono dodając do pożywki MRS-agar odpowiednio: $MnSO_4$ (0,2 g/l), $KMnO_4$ (0,3 g/l), $CoSO_4$ (0,1 g/l), $MgSO_4$ (0,3 g/l), $FeCl_3$ (0,3 g/l). Wpływ zmodyfikowanych warunków doświadczenia na właściwości bakteriocynogenne badanych izolatów wykonano w następującym układzie:

- bakterie *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis* oraz izolaty nr 1, 2, 3, 12, 18 testowano wobec pałeczek *S. enteritidis*;
- izolaty oznaczone jako 16, B, C, E, G testowano wobec pałeczek *E. coli*. Taki układ doświadczenia oparto na wynikach wcześniejszych badań (12).

Doświadczenia powtórzono trzykrotnie.

Wyniki i omówienie

W tab. 1-3 przedstawiono wpływ czynników fizykochemicznych na wzrost i produkcję bakteriocyn przez wybrane bakterie mlekowe.

W obniżonej, w stosunku do optymalnej, temperaturze żaden z badanych izolatów nie wykazał właściwości bakteriocynogennych. Temperatura 37°C w niektórych przypadkach stymulowała antagonistyczne działanie bakterii mlekowych. Tak było w przypadku

Tab. 2. Wpływ pH na produkcję bakteriocyn przez bakterie mlekowe (szerokość stref w mm)

Bakterie mlekowe	Grupa bakterii mlekowych	Patogeny	Kontrola (pH 6,8)	pH		
				5,5	8,0	9,0
<i>L. plantarum</i>	I		3,5	20,0	0	0
<i>L. brevis</i>			6,0	20,0	0	0
1	II	<i>S. enteritidis</i>	2,0	0	0	0
2			2,0	0	0	0
3			2,0	0	0	0
12			2,0	0	0	0
18			2,0	0	0	0
16			3,0	0	0	0
B	II	<i>E. coli</i>	14,5	0	0	0
C			14,0	0	0	0
E			9,0	0	0	0
G			13,0	0	0	0

Objaśnienie: jak w tab. 1.

Tab. 3. Wpływ metali ciężkich na wzrost i produkcję bakteriocyn przez bakterie mlekowe (szerokość stref w mm)

Bakterie mlekowe	Grupa bakterii mlekowych	Patogen	Kontrola (MRS bez metali)	Pożywka MRS zawierająca:				
				MgSO ₄	CoCl ₂	MnSO ₄	FeCl ₃	KMnO ₄
<i>L. plantarum</i>	I		3,5	x	3,0	3,0	0	x
<i>L. brevis</i>			6,0	x	7,0	3,0	0	x
1	II	<i>S. enteritidis</i>	2,0	x	x	x	0	x
2			2,0	x	x	x	0	x
3			2,0	x	x	x	x	x
12			2,0	x	x	x	x	x
18			2,0	x	x	x	x	x
16			3,0	0	0	x	x	x
B	III	<i>E. coli</i>	14,5	9,0	16,0	8,0	9,0	0
C			14,0	8,0	4,0	0	5,0	x
E			9,0	8,0	8,0	5,0	x	6,0
G			13,0	5,0	3,0	3,0	0	4,0

Objaśnienie: x – brak wzrostu bakterii, 0 – brak strefy zahamowania wzrostu

każdego badanego izolatu grupy III. W obrębie grupy I nie zaobserwowano wpływu podwyższonej temperatury na produkcję bakteriocyn, podczas gdy w grupie II doszło najprawdopodobniej do zahamowania ich produkcji.

Badane izolaty bakterii mlekowych nie wykazały zdolności syntezy bakteriocyn w pożywce o odczynie 5,5; 8,0 i 9,0 z wyjątkiem szczepów *L. brevis* i *L. plantarum*, które aktywność bakteriocynogenną ujawniały przy pH 5,5. Optymalnym pH do produkcji bakteriocyn jest pH obojętne.

Dodatek do pożywki jonów metali Mg²⁺ oraz Mn⁷⁺ w przypadku grupy I i II zahamował wzrost bakterii.

Wzbogacenie podłoża w jony Co²⁺, Mn²⁺ dało porównywalne wyniki w szerokości stref z próbą kontrolną w przypadku *L. brevis* oraz *L. plantarum* (grupa I). Natomiast w przypadku wybranych izolatów grupy III jony metali ciężkich nie wpływały znacząco ani na ich wzrost, ani na ujawnienie się właściwości bakteriocynogennych, zwłaszcza w przypadku izolatu B i E.

Drobnoustroje patogenne trafiające do wody wraz ze ściekami identyfikowane są w dużych ilościach w osadach pościekowych. Te ostatnie, nie poddane procesom higienizacyjnym lub podlegające im w niewłaściwy sposób, a następnie wykorzystane do celów przyrodniczych stają się nośnikiem mikroorganizmów chorobotwórczych, takich jak bakterie z rodzaju *Salmonella*, *Escherichia*, *Streptococcus* i in., a także jaj pasożytów (3, 18-20). Dlatego istotne jest powstrzymanie procesu ich rozprzestrzeniania na jak najwcześniejszym etapie.

Coraz więcej uwagi poświęca się bakteriocynom bakterii mlekowych, które mogą odgrywać znaczącą rolę w kontroli oraz regulacji liczby mikroorganizmów patogennych w środowisku (8, 16). Ważne jest określenie wpływu czynników środowiskowych mogących modyfikować efektywność tego oddziaływania, a także ustalenie optymalnych warunków dla ich syntezy. W badaniach własnych modyfikowanymi czynnikami hodowlanymi była temperatura inkubacji, dodatek jonów metali ciężkich oraz pH pożywki. Stwierdzono, że żaden z izolatów bakterii mlekowych nie produkuje bakteriocyn w czasie inkubacji w temperaturze 20°C, z kolei temperatura 37°C aktywuje ich syntezę jedynie u wybranych przedstawicieli grupy drugiej i trzeciej. Zależność pomiędzy produkcją bakteriocyn a temperaturą inkubacji rozważali również Kot i wsp. (11). Testowane przez nich szczepy *L. brevis* F6 oraz *L. brevis* F14 wykazywały niską aktywność przeciwbakteryjną w temperaturze 20°C oraz 37°C, podczas gdy optymalnymi warunkami okazała się temperatura 25°C oraz 30°C.

Badania własne wykazały, iż jony metali ciężkich dodawane do pożywki MRS nie mają większego wpływu na bakteriocynogenność grupy wyizolowanej z preparatu EM, natomiast w pozostałych przypadkach notuje się całkowity brak wzrostu lub też izolaty nie produkują bakteriocyn w obecności wybranych jonów.

W badaniach nad właściwościami *Yersinia enterocolitica* Kot i wsp. (10) określali zależność ujawnie-

nia się bakteriocynogenii od zmienionych warunków hodowli. Wprowadzili dwie modyfikacje: temperaturę inkubacji oraz obecność jonów metali w pożywce. Zaobserwowali, że w badanej populacji występowały szczepy, które wykazywały właściwości bakteriocynogenne w temperaturze 25°C, 30°C, 37°C niezależnie od obecności manganu w podłożu oraz szczepy, które wymagały obecności jonów tego metalu w podłożu do ujawnienia bakteriocynogenii, a wyizolowana jersiniacyna okazała się bakteriocyną bakteriobójczą w stosunku do innych szczepów *Yersinia enterocolitica* oraz niektórych szczepów *Pseudomonas aeruginosa*. Konisky podaje, że bakterie wrażliwe na kolicyny są bardziej odporne na ich działanie w środowisku zawierającym żelazo. Jony żelaza blokują receptory wiążące kolicyny, przez co ogranicza się możliwość ich działania (9). Jony innych metali również modyfikują wrażliwość bakterii na antymikrobiologiczną aktywność bakteriocyn. Kationy sodu, potasu, wapnia oraz magnezu hamują adsorpcję wielu bakteriocyn posiadających wiążące receptory (22). Rekhif i wsp. wykazali, że dodanie do pożywki MgCl₂, CaCl₂, KCl lub NaCl redukuje o 50% adsorpcję bakteriocyny – plantarycyny SA6 do komórek bakterii wrażliwej. Ograniczenie zdolności plantarycyny SA6 do wiązania się z komórką wrażliwą na jej działanie zwiększa przeżywalność atakowanych przez nią bakterii patogennych (21).

W badaniach własnych obserwowano, że optymalnym pH do produkcji bakteriocyn jest pH obojętne. Badane izolaty bakterii mlekowych nie wykazywały zdolności syntezy bakteriocyn w pożywce o odczynie 5,5, 8,0 i 9,0. Wyjątkiem są tu szczepy *L. brevis* i *L. plantarum*, które aktywność bakteriocynogenną ujawniały przy pH 5,5. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy, badając optymalne pH dla produkcji bakteriocyn enterocyny 1146 oraz helwetycyny J wytwarzanej przez *L. helveticus* 481 (7). Jersiniacyna produkowana przez *Yersinia enterocolitica* jest natomiast aktywna w zakresie pH od 3 do 9, ale największa jej aktywność ma miejsce przy pH 7 (10).

Badania wykazały, że spośród bakterii mlekowych jedynie bakterie *L. plantarum*, *L. brevis* oraz izolaty z rodzaju *Lactobacillus* B, C, E i G z preparatu EM Greenland mogłyby skutecznie ograniczać liczebność chorobotwórczych mikroorganizmów. Dać to może pewne podstawy do przyszłościowego ich wykorzystania w procesach utylizacji osadów pościekowych poddanych procesom mezofilnym w warunkach bez-tlenowych.

Piśmiennictwo

1. Arihara K., Ogihara S., Mukai T., Hoh M., Kondo Y.: Salivacin 140, a novel bacteriocin from *Lactobacillus salivarius* subsp. salicinius T140 active against pathogenic bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 1996, 22, 420-424.
2. Chateau N., Castellanos J., Deschamps A. M.: Distribution of pathogen inhibition in the *Lactobacillus* isolates of commercial probiotic consortium. J. Appl. Bacteriol. 1993, 73, 36-40.
3. Czemił J.: Potrzeba poszukiwania nowych metod gospodarowania ściekami komunalnymi. GWiTS 1998, 4, 153-158.
4. Daly C.: Lactic acid bacteria and milk fermentations. J. Chem. Technol. Biotechnol. 1991, 51, 544-548.
5. Hoover G. D., Steenson L. R.: Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press Inc. New York 1993.
6. Jakubczak A., Kot B., Bukowski K.: Badania nad bakteriocynogennym działaniem bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do wybranych drobnoustrojów. Medycyna Wet. 1995, 51, 754-756.
7. Joerger M. C., Klaenhammer T. R.: Characterization and purification of helveticin J and evidence for chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 1986, 167, 439-446.
8. Juven B. J., Meinersmann R. J., Stern N. J.: Antagonistic effects of lactobacilli and pediococci to control intestinal colonization by human enteropathogens in live poultry. J. Appl. Bacteriol. 1991, 70, 95-103.
9. Konisky J.: The Bacteriocins. Academic Press Inc., New York 1978, 6, 71-136.
10. Kot B., Bukowski K., Jakubczak A.: Analiza bakteriocynogennych właściwości szczepów *Yersinia enterocolitica*. Med. Dośw. Mikrobiol. 1998, 51, 91-101.
11. Kot B., Jakubczak A., Bukowski K.: Influence of temperature on antibacterial activity of lactic acid bacteria against gram-negative bacteria. Polish J. Vet. Sci. 1999, 4, 175-177.
12. Ligocka A., Paluszak Z.: The capability of lactic acid bacteria to pathogens inhibition in sewage sludge subject to biotechnological processes. Praca w druku w Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy.
13. Łaniewska-Moroz L., Warmińska-Radyko I.: Bakteriocyny syntetyzowane przez *Lactobacillus*. Biotechnologia 1998, 1, 53-62.
14. Mital B. K., Garg S. K.: Anticarcinogenic, hypocholesterolemic and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. Crit. Rev. Microbiol. 1995, 21, 175-214.
15. Mortvedt-Abildgaard Ch. I., Niessen-Meyer R. J., Jelle B., Grenov B., Skågen M., Nes I. F.: Production and pH – dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L-45. Appl. Environ. Microbiol. 1995, 61, 175-179.
16. O'Keeffe T., Hill C.: Bacteriocins. Potential in Food Preservation. Academic Press. Ireland 1999.
17. Ogunbanwo S. T., Sanni A. I., Onilude A. A.: Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. Afr. J. Biotechnol. 2003, 2, 179-184.
18. Paluszak Z., Bauza-Kaszewska J., Ligocka A.: Przeżywalność pałeczek *Salmonella senftenberg* W₇₇₅ w osadach pościekowych poddanych procesowi kompostowania. Medycyna Wet. 2003, 59, 239-243.
19. Paluszak Z., Bauza-Kaszewska J., Ligocka A., Olszewska H., Philipp W.: Mikrobiologisch-seuchenhygienische Untersuchungen bei der Kompostierung von Klarschlamm zur landwirtschaftlichen Verwertung. Tierärztl. Umschau 2003, 58, 297-303.
20. Paluszak Z., Ligocka A., Olszewska H.: Inaktywacja jaj *Ascaris suum* w kompostowanych osadach ściekowych. Medycyna Wet. 2003, 59, 154-157.
21. Rekhif N., Atrih A., Lefebvre G.: Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. J. Appl. Bacteriol. 1995, 78, 349-358.
22. Sip A.: Produkcja bakteriocyn przez bakterie mlekowe. Biotechnologia 1999, 2, 145-165.

Adres autora: dr Anna Ligocka, ul. Bernardyńska 6/8, 85-029 Bydgoszcz; e-mail: mikro@atr.bydgoszcz.pl

BILDFELL R. J., HEDSTROM O. R., DEARING P. L.: Ognisko dermatofity u norek hodowlanych w USA. (Outbreak of dermatophytosis in farmed mink in the USA). Vet. Rec. 155, 746-748, 2004 (23)

W dużej grupie norek w wieku 6 miesięcy na fermie liczącej 10 tys. samiec pojawiły się asymetrycznie usytuowane nieregularnego kształtu wyłysienia i zgrubienia skóry o średnicy do 6 cm. Najwięcej zmian występowało na skórze grzbietu. W zeszkrobienie pochodzącej z chorobowo zmienionych odcinków skóry nie stwierdzono obecności pasożytów. Badaniem histologicznym zdiagnozowano ropno-ziarniniakowate zapalenie skóry, zapalenie mieszków włosowych, parakeratozę i nitki grzybni oraz nieliczne artrospory. Ze zmian chorobowych wyizolowano *Trichophyton mentagrophytes* i *Staphylococcus aureus*. Wszystkie chore zwierzęta zlikwidowano. W następnym sezonie hodowlanym zmiany o podobnym charakterze wystąpiły u 700 szczeniąt. Były one usytuowane głównie na skórze głowy, grzbiecie tułowia i na kończynach. Ze zmian wyizolowano *Trichophyton mentagrophytes*. U wszystkich zwierząt zastosowano gryzeofulwinę podawaną z karmą przez okres 2 tygodni, a szczenięta otrzymywały karmę z antybiotykiem przez dalsze 5 dni. Do odkażania zastosowano captan. Zmiany chorobowe zaczęły ustępować po 7-10 dniach. Nie stwierdzono nowych zachorowań.

G.