

PRAKTYKA LABORATORYJNA

BARBARA OBUCHOWSKA-DUS
Wrocław

Wpływ podłoża wzbogacającego oraz warunków namnażania wstępnego na częstość izolacji salmonel z mączek rybnych

W ostatnich latach w badaniach naukowych poświęca się wiele uwagi metodom wykrywania salmonel w mączkach pastewnych oraz możliwościom ulepszenia tych metod (15, 33). Rohde i Bischoff (25) pierwsi zwrócili uwagę na to, że mączki rybne mogą odgrywać dużą rolę w epizootologii salmoneloz a za pośrednictwem zwierząt mogą również stanowić źródło zakażeń u ludzi. Izolacja pałeczek *Salmonella* z suchych produktów natrafia jeszcze na duże trudności (19). Bakterie te, bowiem, na skutek działania na nie różnych procesów technologicznych, ulegają uszkodzeniu. Uszkodzenie komórek bakteryjnych występujących w mączkach wynikają nie tylko z działania na nie procesu suszenia lecz również są one następstwem stosowania w produkcji podwyższonych temperatur (1, 14, 24, 26, 30). Często dochodzi do zaburzeń w działalności ich układu enzymatycznego i metabolicznego, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia ich zdolności regeneracyjnych w czasie hodowli w podłożach bakteryjnych (4, 6, 12, 32). W wielu przypadkach pracownicy laboratoriów nie biorą pod uwagę faktu, że znaczna część bakterii znajdujących się w badanych próbkach wykazuje różnego rodzaju uszkodzenia i że reprodukcja a więc i wzrost tych bakterii są możliwe często po zastosowaniu odpowiedniej techniki laboratoryjnej (33) lub odpowiedniego środowiska biochemicznego (27, 28).

Sinsky i wsp. (28) oraz Lewicki i wsp. (18) stwierdzili, że wysuszone komórki bakteryjne posiadają większe wymagania odżywcze niż komórki niewysuszone i dlatego często nie rosną one w prostych podłożach bakteryjnych. Wysuszone komórki bakteryjne posiadają obniżoną lub całkowicie utraconą aktywność katalazy. Prawdopodobnie, między innymi, dlatego w wielu przypadkach uzyskuje się lepsze wyniki przy dodatku do podłoża krwi, która zawiera katalazę w dużych ilościach (2, 3, 6, 18). Regeneracja wysuszonych komórek bakteryjnych zależy na pewno jeszcze od wielu innych składników podłoża czy środowiska (15, 18, 33). Dobór podłoża przy izolacji salmonel odgrywa zasadniczą rolę zwłaszcza przy badaniu materiału zawierającego częściowo uszkodzone komórki pałeczek *Salmonella* lub małą ilość tych bakterii (7, 12, 16, 32). Oprócz składu chemicznego podłoża (4, 15, 17, 29), duży wpływ na uzyskiwane wyniki badań, w przypadku badania produktów suchych, posiada temperatura rehydratacji (33) lub temperatura inkubacji. Lewicki i Silverman (18) sugerują, że bez względu na środowisko, w którym bakterie ulegały wysuszeniu, najbardziej optymalne wyniki uzyskuje się przy zastosowaniu temperatury rehydratacji 20°C.

Do niedawna większość laboratoriów na świecie przy badaniu różnych próbek na obecność salmonel stosowała przy inkubacji podłoża temp. 37°C (20). Inni (8, 11, 31) uzyskiwali lepsze wyniki przy temp. 43°C. Harris (10), Hansen i Rieman (9) podkreślają, że warunki inkubacji optymalne dla nieuszkodzonych komórek bakteryjnych nie mogą być bezkrytycznie odnoszone do komórek uszkodzonych procesem ogrzewania. Duży wpływ na wynik badania w kierunku pałeczek *Salmonella* posiada czas inkubacji posiadanych podłoża (5, 13, 22, 23, 34).

Piśmiennictwo dotyczące metodyki izolacji salmonel z materiału zwierzęcego oraz ze środków spożywczych jest bardzo bogate. W odniesieniu jednak do produktów poddanych różnym zabiegom technologicznym a w tym i suszeniu, w których system regeneracyjny salmonel ulega częściowemu uszkodzeniu, daje się odczuwać duży brak obiektywnych metod badania, które odzwierciedlałyby faktyczny stan zakażenia (33).

Udoskonalenie metod izolacji salmonel z mączek pastewnych może mieć duże znaczenie z wielu względów. Wprowadzanie na coraz to szerszą skalę na całym świecie wielkostadnej hodowli zwierząt a zwłaszcza trzody chlewnej i drobiu oraz intensyfikacja produkcji zwierzęcej wymaga coraz szerszego zastosowania w żywieniu zwierząt wysokobiałkowych pasz a zwłaszcza mączek pastewnych pochodzenia zwierzęcego. Zakażenia salmonelami mogą mieć duże ujemne skutki zarówno dla samej produkcji zwierzęcej, dla czystości środowiska gospodarstw produkcyjnych jak i dla zdrowia ludzi.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły 192 próbki mączki rybnej importowanej z Ameryki Południowej.

Z każdej próbki odważano 100 g mączki i mieszało z 900 ml bulionu odżywczo z dodatkiem 0,5% mannitolu, do uzyskania jednolitego homogenizatu. Po 15 min. rehydratacji w temp. pokojowej przenoszono każdorazowo po 9 ml homogenizatu do 12 pustych probówek oraz 12 probówek zawierających po 1 ml krwi baraniej odwołnionej. W ten sposób uzyskano 2 warianty podłoża po 12 probówek. Po jednej probówce z każdego wariantu inkubowano w następujących warunkach: w temp. 25°, 37° i 43°, przy dostępie tlenu oraz w warunkach beztlenowych, przez 24 i 48 godz.

Warunki beztlenowe uzyskiwano w kloszach do hodowli bakterii beztlenowych przez dwukrotne wypomrowanie powietrza i wprowadzenie na jego miejsce mieszaniny propanu (65%) i butanu (35%). Po inkubacji, z każdej probówki dokonywano era bezpośredniego przesiewu na agar z zielenia brvntowa i czerwienia fenolową (BG). Prócz tego po 1 ml przenoszono do 10 ml podłoża z czterotianem sodowym, 3/6cia i zielenia brvntowa (Müller-Kauffmanna), które inkubowano każdorazowo w temp. 43° przez 48 godz. Następnie z podłoża Müller-Kauffmanna wykonywano przesiew na agar BG. Agar inkubowano każdorazowo w temp. 37° przez 24 godz. W przypadku uzyskania wzrostu na tym podłożu z każdej płytki wybierano do dalszych badań losowo po 5 kolonii podejrzanych o przynależność do rodzaju *Salmonella*.

Właściwości biochemiczne wybranych kolonii sprawdzano na podłożu TSI. Kolonie wyróżnione na podłożu TSI badano następnie metodą aglutynacji szkiełkowej przy użyciu wieloważnej surowicy dla antygenów rząskowych (HM), surowic grupowych dla antygenów somatycznych oraz surowic dla poszczególnych antygenów rząskowych. Wyizolowane szczepy nastrożające trudności w rozpoznawaniu przesyłano do Krajowego Ośrodka *Salmonella* w Gdańsku.

Wyniki

Spośród 192 przebadanych prób mączki rybnej w 66 (34,4%) przypadkach stwierdzono obecność pałeczek *Salmonella*. W 66 zakażonych próbach wyniki dodatnie uzyskano 364 razy stosując powyższą metodykę badań. Określono 6 rodzajów *Salmonella*: *Salmonella derby*, *S. oranienburg*, *S. tenessee*, *S. senftenberg*, *S. havana* i *S. cubana*. Jeden szczerp nastroczający duże trudności przy badaniu wysłano do Paryża poprzez Krajowy Ośrodek *Salmonella* w Gdańsku. Wyniku dotąd nie otrzymano.

Przez wiele lat przy izolacji salmonel z różnych produktów inkubowano podłoża bakteryjne w temp. 37°. Ostatnio jednak niektórzy autorzy (8, 11, 16) uzyskiwali lepsze wyniki przy temp. 43° lub niższej od 37° (21). Biorąc pod uwagę, że w takich produktach jak suche mączki pastewne bakterie przebywają często przez szereg tygodni lub miesięcy w niższych temperaturach, zastosowano również w niniejszych badaniach temp. 25°. Na 364 dodatnie wyniki 33,2% stwierdzonych pał. *Salmonella* uzyskano w temp. 25°. Nieco gorsze wyniki otrzymano w wariancie z temp. 43° (32,4% wyników dodatnich) a lepsze przy temp. 37° (34,0% wyników dodatnich). Przy szczegółowej analizie wszystkich wyników badań można zauważyć, że wpływ temperatury namnażania wstępnego na liczbę dodatnich wyników nie jest zjawiskiem jednostronnym i może zależeć w pewnym stopniu od innych parametrów jak np. dostęp tlenu atmosferycznego czy skład podłoża wzrostowego.

Tab. 1. Wpływ temperatury i czasu namnażania wstępnego oraz tlenu cząsteczkowego na częstość izolacji salmonel z mączki rybnej

Warunki namnażania wstępnego		temperatura						Razem	
		25°C		37°C		43°C			
Czas w godz.	T	B	T	B	T	B	liczba	%	
		24	21	27	27	32			30
48	35	38	28	37	27	29	194	53,3	
Razem	56	65	55	69	57	62	364		

Objaśnienia: T = inkubacja w warunkach dostępu tlenu (razem 168 tj. 46,1%); B = inkubacja beztlonowa (razem 196 tj. 53,8%).

Beztlenowe warunki inkubacji (tab. 1) stworzyły lepsze szanse na uzyskanie pozytywnych wyników w porównaniu z analogiczną hodowlą przy dostępie tlenu. W atmosferze dostępu tlenu cząsteczkowego otrzymano 168 (46,1%) wyników dodatnich, podczas gdy z tej samej ilości prób równoległych w warunkach beztlenowych liczba wyników dodatnich wyniosła 196 (53,8%). Należy jednak zaznaczyć, że ten korzystny wpływ warunków beztlenowych wystąpił tylko przy temp. 25° i 37°.

Z danych przedstawionych w tab. 1 wynika, że czas namnażania wstępnego dwukrotnie dłuższy tj. 48 godz. zwiększył liczbę wyizolowań salmonel ze 170 (46,7%) po 24 godz. namnażania do 194 (53,3%). Jest to różnica wyraźna i wydaje się być istotną dla właściwej diagnostyki badanych produktów suchych. Można przyjąć, że przedłużenie namnażania wstępnego do 48 godz. zwiększa szanse uzyskania bardziej obiektywnych wyników. Ale to zjawisko zależy również w dużym stopniu od środowiska wzrostu oraz pozostałych parametrów inkubacji.

Niektórzy badacze stwierdzili lepszą wykrywalność salmonel przy zastosowaniu inkubacji wstępnej (7, 34) oraz odpowiednio dobranych podłoży wzbogaconych (2, 3, 6, 18). W niniejszej pracy wykazano zwiększenie wykrywalności tych bakterii przy wzbogaceniu bulionu z mannitolem dodatkiem krwi. Na ogólną liczbę 364 dodatnich wyników 163 (44,7%) razy stwierdzono salmonelę przy użyciu bulionu z mannitolem bez innych dodatków. Dodatek krwi natomiast zwiększył szanse wykrycia do 201 (55,2%) razy. Wiadomo, że komórki bakteryjne znajdujące się w stanie wysuszenia regenerują się stosunkowo trudno i że dla ich wzrostu potrzeba odpowiedniego środowiska bogatego w czynniki wzrostowe. Krew zawiera takie

czynniki a uzyskane wyniki badań przemawiają za tym, że jej dodatek do podłoża zwiększa szansę izolacji salmonel z produktów suszonych.

Liczby dodatnich wyników przedstawionych w tab. 2 wykazują, że namnażanie badanego materiału na bulionie z mannitolem a następnie przesiew bezpośredni na agar BG pozwoliło stwierdzić obecność salmonel 57 (15,6%) razy podczas gdy namnażanie wstępne na tym podłożu z przesiewem na wybiórcze podłożo Müller-Kauffmanna a następnie na agar BG zwiększyło liczbę dodatnich wyników do 106 (29,1%). Po-

Tab. 2. Porównanie jednostopniowego i dwustopniowego namnażania oraz dodatku krwi do bulionu z mannitolem na częstość izolacji salmonel z mączki rybnej

Rodzaj podłoża nieselektywnego do namnażania wstępnego	Metoda namnażania		Razem
	Namnażanie wstępne na podłożu nieselektywnym z następnym przesiewem bezpośrednim na agar BG	Namnażanie wstępne na podłożu nieselektywnym z przesiewem na wybiórcze podłożo MK a następnie na agar BG	
Bulion z mannitolem	57 (15,6%)	106 (29,1%)	163 (44,7%)
Bulion z mannitolem + 10% krwi	82 (22,2%)	119 (32,7%)	201 (55,2%)
Razem	139 (38,1%)	225 (61,2%)	364

dobnie przedstawia się stosunek namnażania wstępnego dwustopniowego na bulionie z dodatkiem krwi. Sumując otrzymane wyniki jednostopniowego i dwustopniowego namnażania widać wyraźną różnicę 139 (38,1%) i 225 (61,2%) wyników dodatnich na korzyść tego ostatniego. Szczegółowa analiza wszystkich wyników badań wykazuje, że różne kombinacje podłoży namnażania wstępnego z różnymi warunkami inkubacji mogą dawać różne lub nawet rozbieżne wyniki. Dlatego nie można uogólniać pewnych zasad, że w każdym przypadku najbardziej obiektywne wyniki uzyska się stosując dane podłożo, dany czas inkubacji, określoną temperaturę czy też beztlonowe warunki inkubacji. Każdy z tych parametrów należy rozpatrywać w całym zespole innych parametrów towarzyszących a przy tym należy jeszcze brać pod uwagę inne czynniki, jak np. typ *Salmonella*, zestaw mikroflory towarzyszącej, skład chemiczny i wielkość badanej próbki itd.

Wydaje się jednak, że w oparciu o uzyskane wyniki można wyprowadzić pewne wnioski, które mogą znaleźć zastosowanie w praktyce laboratoryjnej.

Wnioski

1. Spośród zastosowanych temperatur namnażania wstępnego 25°, 37° i 43° dla wykazania obecności pałeczek z rodzaju *Salmonella* w mączkach rybnych odpowiedniejszą wydaje się temp. 25° i 37°.

2. Namnażanie wstępne w warunkach beztlenowych pozwala stwierdzać częściej obecność salmonel w mączkach pastewnych niż namnażanie wstępne przy dostępie tlenu.

3. Długość czasu namnażania wstępnego mączek pastewnych ma istotne znaczenie. Wyraźnie więcej salmonel stwierdza się stosując namnażanie wstępne przez 48 godz. aniżeli przez 24.

4. Dodatek krwi i dwustopniowe namnażanie wstępne przy izolacji salmonel z mączek pastewnych zwiększa wykrywalność tych bakterii w porównaniu z jednostopniowym namnażaniem na podłożach nieselektywnych.

Piśmiennictwo

- Allwood M. C., Russel A. D.: Appl. Microbiol. 15, 1266, 1967.
- Annear D. I.: Aust. J. exp. Biol. med. Sci. 41, 575, 1963.
- Baird-Parker A. C., Davenport E.: J. appl. Bacteriol. 28, 390, 1965.
- Banwart G. J., Ayres J. C.: Appl. Microbiol. 1, 296, 1963.
- Carlson V. I., Snoeyenbos G. H., McKie B. A., Smyser C. F.: Avian Dis. 11, 217, 1967.
- Fisher P. J.: J. appl. Bacteriol. 25, 502, 1963.
- Galton M. M., Boring J. R., Martin W. T.: National Communicable Disease Centre, Atlanta, Georgia, March 1964.
- Hansgen D. L., Boothroyd M.: J. appl. Bact. 28, 206, 1965.
- Hansen N. H., Rietman H.: J. appl. Bact. 26, 314, 1963.

10. Harris N. D.: J. appl. Bact. 26, 387, 1963.
11. Harvey R. W. S., Thomson S.: Monthly Bull. Minist. Health (Lond.) 12, 149, 1953.
12. Hobbs B. C.: Ann. Inst. Pasteur, 104, 621, 1963.
13. Huntanen C. N., Naghski J.: Appl. Microbiol. 23, 573, 1972.
14. Iandolo J. J., Ordal Z. J.: J. Bacteriol. 91, 134, 1966.
15. Kafel S.: Wyniki nieopublikowane, 1964.
16. Kafel S.: Mat. Konf. Nauk. WZwet. Gdańsk, 1969.
17. Leifson E.: Amer. J. Hyg. 24, 423, 1936.
18. Lewicki P. P., Silverman G. J.: Proc. VI Intern. Symp. on Food Microbiol., Bilthoven, 106, 1968.
19. Maciak T., Trippenbach B.: Med. Wet. 8, 492, 1963.
20. McCoy J.: J. appl. Bact. 25, 213, 1962.
21. Mossel D. A. A., Vincentie H. M.: Proc. VI Intern. Symp. on Food Microbiol., Bilthoven, 135, 1968.
22. National Academy of Science, Washington, D. C., 1971.
23. Osborne W. W., Stokes J. L.: Appl. Microbiol. 3, 295, 1955.
24. Pablo I. S., Sinskey T. J., Silverman G. J.: Food Technol. 21, 64, 1967.
25. Rohde R., Bischoff J.: Zbl. Bakt. I. Abt. Orig. 195, 146, 1956.
26. Russel A. D., Harris D.: Appl. Microbiol. 15, 407, 1967.
27. Silverman G. J., Goldblith S. A.: Advances in Appl. Microbiol. 7, 305, 1965.
28. Sinskey T. J., McIntosh A. H., Pablo I. S., Silverman G. J., Goldblith S. A.: Health Lab. Sci. 1, 297, 1964.
29. Smith H. W.: J. Hyg. 50, 21, 1952.
30. Sogin S. J., Ordal Z. J.: J. Bacteriol. 94, 1082, 1967.
31. Spino D. F.: Appl. Microbiol. 14, 591, 1966.
32. Thomson S.: J. Hyg. 53, 217, 1955.
33. Truszczyński M., Służewska M.: Med. Wet. 5, 266, 1973.
34. Van Schothorst M., Kampelmacher E. H.: Proc. VI Intern. Symp. on Food Microbiol., Bilthoven, 193, 1968.

Adres autora: dr Barbara Obuchowska-Duś, 53-321 Wrocław, ul. Sztabowa 59 m 1.

MICHAŁ BARTOSZCZE
Puławy

Przystosowanie diaskopu do liczenia tysinek w hodowlach komórek

Istniejące aktualnie tendencje do wprowadzenia mikrometod do badań wirusologicznych mają na celu między innymi uzyskanie oszczędności w zużyciu drogich zazwyczaj płynów odżywczych i odczynników, zmniejszenie pracochłonności i skrócenie czasu wykonywania doświadczeń. Przykładem tego jest coraz powszechniej stosowana metoda mikrołysinek w próbkach. Zasady ogólne tej metody jakkolwiek nie odbiegają zasadniczo od testu wprowadzonego przez Dulbecco (1) są jednak jego znaczną modyfikacją.



Ryc. 1. Przystosowana do diaskopu Profil B-4 metalowa ramka wraz z zamocowaną próbką typu La Melle.

Jednociele wyrośniętą warstwę hodowli komórek w próbkach zakaża się wirusem i po jego adsorpcji do hodowli wprowadza się płyn odżywczy zawierający

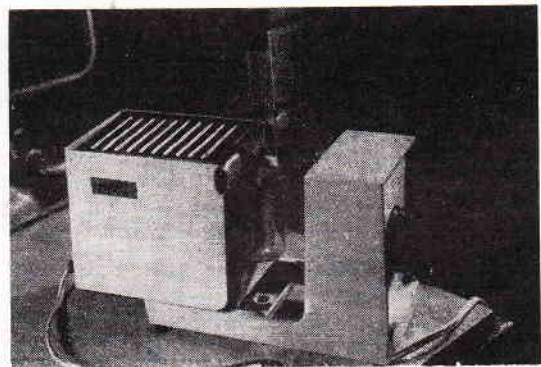
Обуховска-Дуś Б. — Влияние обогащающей среды и условий предварительного культивирования на частоту изоляции салмонелл из рыбной муки.

В работе применяли 48 часовую преинкубацию в 25°, 37° и 43° (также в анаэробных условиях). Установили, что добавление к среде 10% крови барана увеличило количество выделенных из сухой рыбной муки штаммов Salmonella. Выделенные штаммы принадлежали к 6 следующим видам: Salmonella derby, S. oranienburg, S. senftenberg, S. tenessee, S. havana, S. cubana.

Obuchowska-Duś B. — The influence of an enriched medium and conditions of preliminary multiplication on the frequency of Salmonella isolation from fish meals.

Bone-meat meals and fish meals are more often used nowadays than in the past, and therefore there is a necessity to elaborate suitable methods to detect Salmonella strains, which often contaminate these dry products. The experiments were carried out 25°, 37° and 43°C. and on different media. The best results were obtained on the medium with 10% of ram blood under anaerobic conditions and 48 hrs preincubation period. There were found 6 species of Salmonella, i.e. S. derby, S. oranienburg, S. senftenberg, S. tenessee, S. havana, and S. cubana.

cy roztwór Parkera z dodatkiem 10% surowicy cielęcej, zmieszany w stosunku 1:1 z 2% metylocelulozą (2). Ten ostatni składnik zapobiega uwalnianiu się



Ryc. 2. Przygotowany do pracy rzutownik Profil B-4. Widoczna ramka z próbką.

wirusa i zakażaniu innych komórek. Łysinki przedstawiają okrągłe o różnej wielkości niezabarwione miejsca uszkodzonych komórek na tle zabarwionych (czerwienią obojętną) komórek zdrowych.

Opisany w skrócie test znajduje szerokie zastosowanie w badaniach wirusologicznych, a między innymi przy mianowaniu wirusów, określaniu aktywności interferonu itp.

Rutynowe stosowanie opisanej metody z uwagi na małą wielkość łysinek (przy wczesnych odczytach), przy dużym ich zagęszczeniu czyni pracę bardzo żmudną, męczącą dla wzroku, a ponadto otrzymywane wyniki obarczone są dość znacznym błędem zwiększającym się wraz ze zmęczeniem odczytującego pracownika.