

ELŻBIETA JÓZWIK, STANISŁAW KAFEL

Modyfikacja płynnego podłoża Chapmana do wykrywania gronkowców koagulazo-dodatnich w mięsie

Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego AR-T,
10-937 Olsztyn Kortowo

Wykrycie w toku badań rutynowych żywności niewielkiej liczby gronkowców wobec licznej mikroflory towarzyszącej wymaga stosowania odpowiednio dobranych podłoży. Dotychczas opracowano wiele podłoży selektywnych dla gronkowców, w których wykorzystuje się tolerancję tych drobnoustrojów na czynniki hamujące wzrost innych bakterii oraz ich właściwości enzymatyczne. Zaliczamy do nich podłoże stałe i płynne Chapmana (4), uwzględniające zdolność gronkowców, w przeciwieństwie do innych bakterii, do wzrostu i rozmnażania się przy wysokich stężeniach chlorku sodowego, a ponadto umożliwiające, dzięki zawartości mannitolu i czerwieni fenolowej, odróżnianie gronkowców fermentujących mannitol od niefermentujących. Innym podłożem proponowanym przez standardy międzynarodowe ISO jest podłoże płynne Giolitti-Cantoni (5) o składzie zbliżonym do podłoża Baird-Parkera. Oba te podłoża są również zalecane przez polską normę (11). Żadne z tych podłoży nie jest jednak doskonałe i ciągle prowadzone są prace nad ich przydatnością w badaniu żywności (2, 3, 8, 10). Z tego względu podjęto próbę opracowania nowego podłoża, które zwiększyłoby stopień wykrywalności gronkowców koagulazo-dodatnich w mięsie mielonym.

Celem badań było:

a) porównanie wykrywalności gronkowców koagulazo-dodatnich w materiale sztucznie zakażonym przy zastosowaniu płynnego podłoża Chapmana i jego trzech modyfikacji oraz podłoża Giolitti-Cantoni,

b) określenie stopnia wykrywalności gronkowców koagulazo-dodatnich w mięsie mielonym bez dodatkowego zakażenia sztucznego, przy użyciu wymienionych podłoży namnażających.

Materiał i metody

Podłoża bakteriologiczne:

— podłoże Chapmana płynne (4) o składzie: wyciąg mięsny — 1000,0, pepton proteose — 9,0, chlorek sodowy — 75,0, mannitol — 10,0, czerwień fenolowa, 0,2% roztw. alkohol. — 10,5,

— podłoże Chapmana płynne zmodyfikowane przez zalanie go po posiewie około dwucentymetrową warstwą 2% agaru wodnego (podłoże ChA),

— podłoże Chapmana płynne, zmodyfikowane przez zmniejszenie zawartości chlorku sodowego z 7,5% do 3% (podłoże C),

— podłoże Chapmana płynne, zmodyfikowane przez zmniejszenie zawartości chlorku sodowego do 3% i po posiewie zalewane agarem wodnym (podłoże CA) jak w podłożu ChA,

— podłoże Giolitti-Cantoni (5) — skład i przygotowanie zgodnie z PN (11),

— podłoże Baird-Parkera (1), skład i przygotowanie wg PN (11).

Próbki do badań: badany materiał stanowiły 44 próbki mięsa mielonego, zakupione w handlu detalicznym. Badania przeprowadzono w dwóch częściach. W I części próbki zakażono dodatkowo szczepem gronkowca koagulazo-dodatniego, w II części natomiast badano naturalne zakażenie gronkowcami.

Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej: wyizolowany z mięsa szczep gronkowca, koagulazo- i lipazo-dodatni hodowano na skosie agarowym w temperaturze 37°C przez 24 godziny i sporządzono z niego zawiesinę bakteryjną w płynie do rozcieńczeń, zawsze o gęstości I wg skali McFarlanda.

Sposób zakażenia mięsa i wykrywania obecności gronkowców: z próbki mięsa mielonego odważano 10 g w jałowej kolbce, zalewano 40 ml płynu do rozcieńczeń i dokładnie mieszano uzyskując w ten sposób rozcieńczenie podstawowe 1:5. W I części badań do tego rozcieńczenia wsiewano dodatkowo 0,1 ml zawiesiny gronkowcowej, przygotowanej uprzednio i wytrząsano. Następnie badany materiał przesączano przez watę i sporządzano z niego dalsze rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-8} . Z tych rozcieńczeń wykonywano posiewy po 1 ml na podłoża płynne w próbkach: Giolitti-Cantoni, Chapmana oraz podłoża ChA, C i CA. Posiane podłoża inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po inkubacji, z podłoży tych wykonywano przesiewy eż na podłoże Baird-Parkera (1), tak by uzyskać izolowane kolonie. Po 48-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, podejrzone kolonie izolowano i identyfikowano przez sprawdzenie ich właściwości fizjologicznych i biochemicznych, takich jak: wytwarzanie katalazy, zdolność rozkładu glukozy i mannitolu w warunkach beztlenowych oraz wytwarzanie koagulazy i fosfatazy. Za miano gronkowców uznawano najwyższe rozcieńczenie próbki, w którym stwierdzono obecność tych bakterii.

Wyniki i omówienie

Wyniki I części badań przedstawiono w tab. 1. Porównując wyniki uzyskane na podłożu Giolitti-Cantoni z podłożem Chapmana stwierdzono, że wyższe miano na podłożu Giolitti-Cantoni uzyskano w 13 przypadkach, jednakowe w 6 przypadkach i niższe tylko w 1 przypadku na 20 badań. Na podłożu Giolitti-Cantoni uzyskano również lepszą wykrywalność gronkowców w porównaniu z podłożem Chapmana zalanym po posiewie warstwą agaru (ChA), mianowicie 9-krotnie wyższe miano i 11-krotnie równe. Podobną natomiast wykrywalność gronkowców zauważono w przypadku podłoży Giolitti-Cantoni i dwóch pozostałych modyfikacji podłoża Chapmana — C i CA. W podłożu Giolitti-Cantoni w 5 próbach miano było wyższe, w 10 próbach jednakowe i również w 5 niższe w porównaniu z podłożem C. Natomiast w porównaniu z podłożem CA w 11 przypadkach było równe, w 4 przypadkach niższe, a w 5 przypadkach wyższe. Wynika stąd,

Tab. 1. Miano gronkowców koagulazo-dodatnich w mięsie sztucznie zakażonym uzyskiwane w podłożach: Giolitti-Cantoni, Chapmana i jego zmodyfikowanych wariantach ChA, C i CA

Nr próby	Rozcieńczenie, w którym stwierdzono jeszcze wzrost gronkowców				
	Podłoże Giolitti-Cantoni	Podłoże Chapmana	Podłoże ChA	Podłoże C	Podłoże CA
1	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
2	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
3	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
4	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
5	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
6	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
7	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
8	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
9	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
10	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
11	10 ⁻⁶	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
12	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
13	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
14	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
15	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷
16	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
17	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
18	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
19	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
20	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶

że w podłożach Giolitti-Cantoni, C i CA uzyskuje się zbliżoną wykrywalność gronkowców, niższą natomiast dają podłoża Chapmana i ChA.

Porównując ze sobą wykrywalność gronkowców koagulazo-dodatnich na podłożu Chapmana i jego modyfikacjach należy stwierdzić, że była ona nieco wyższa w podłożu ChA, niż w podłożu Chapmana i wyraźnie wyższa w obu pozostałych wariantach zmodyfikowanego podłoża Chapmana — C i CA. Obie te modyfikacje dały w tej części badań wyniki w zasadzie równorzędne.

Wyniki uzyskane w II części pracy przedstawia tab. 2. Najlepszą wykrywalność uzyskano posługując się podłożem CA. W podłożu tym osiągnięto w porównaniu z podłożem Giolitti-Cantoni we wszystkich 24 próbach wyższe miano, z podłożem Chapmana — w 23 przypadkach wyższe i w 1 równe, w porównaniu z podłożem ChA miano wyższe było 21 razy, równe 2 razy i w 1 przypadku niższe. Wyniki najbardziej zbliżone do uzyskanych na podłożu CA osiągnięto na podłożu C, ale były one także nieco gorsze, tzn. w 10 przypadkach miano na podłożu C było niższe, w 10 przypadkach równe i w 4 przypadkach wyższe niż na podłożu CA. W obu tych podłożach — CA i C wykrywalność gronkowców koagulazo-dodatnich, oceniana na podstawie wysokości miana w badanych próbkach, była wyższa niż na pozostałych podłożach. Najniższą liczbę pozytywnych wyników uzyskano na podłożu Chapmana.

Analizując wyniki zawarte w tab. 2 uzyskane na podłożu Chapmana oraz jego modyfikacjach ChA, C i CA, można zauważyć, że wy-

Tab. 2. Miano gronkowców koagulazo-dodatnich w mięsie naturalnie zakażonym uzyskiwane w podłożach: Giolitti-Cantoni, Chapmana i jego zmodyfikowanych wariantach ChA, C i CA

Nr próby	Rozcieńczenie, w którym stwierdzono jeszcze wzrost gronkowców				
	Podłoże Giolitti-Cantoni	Podłoże Chapmana	Podłoże ChA	Podłoże C	Podłoże CA
1	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
2	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵
3	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁶
4	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
5	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
6	10 ⁻³	—	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
7	10 ⁻⁴	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
8	10 ⁻⁴	—	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
9	10 ⁻¹	—	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
10	10 ⁻¹	—	10 ⁻¹	10 ⁻⁴	10 ⁻³
11	10 ⁻²	—	10 ⁻¹	10 ⁻⁴	10 ⁻³
12	10 ⁻²	—	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
13	—	—	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²
14	—	—	—	10 ⁻¹	10 ⁻¹
15	10 ⁻¹	—	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻²
16	—	—	10 ⁻²	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴
17	—	—	—	10 ⁻²	10 ⁻³
18	—	—	—	10 ⁻¹	10 ⁻²
19	—	—	—	—	10 ⁻¹
20	—	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹
21	—	—	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³
22	—	—	—	10 ⁻²	10 ⁻¹
23	10 ⁻³	—	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
24	10 ⁻³	—	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻⁴

Objaśnienie: — = brak wzrostu.

krywalność w podłożach zalewanych po posiewie agarem, a więc ChA i CA, była wyższa niż w wersjach podłoża nie zalewanych, czyli Chapmana i C. I tak miano na podłożu Chapmana było w 6 przypadkach równe i w 18 przypadkach niższe niż na podłożu ChA, podobnie jak w przypadku porównania podłoży C i CA.

W trakcie odczytywania posiewów w toku badań zauważono, że przy przesiewie z podłoża Giolitti-Cantoni na płytce z podłożem Baird-Parkera otrzymywano czysty wzrost gronkowców koagulazo-dodatnich, z wyraźnymi strefami „egg-yolk”, bez wzrostu mikroflory obcej, natomiast na płytkach z przesiewu z podłoża Chapmana obserwowano wzrost mikroflory towarzyszącej. Jeszcze silniejszy wzrost tej mikroflory występował w przypadku przesiewów z podłoża Chapmana zmodyfikowanego przez zmniejszenie zawartości soli do 3% — C. Pomimo jednak wzrostu mikroflory obcej, różnicowanie i izolacja gronkowców koagulazo-dodatnich nie przedstawiały trudności. Kolonie gronkowców miały typowy wygląd, były dość duże, okrągłe, wypukłe, koloru czarnego z odcieniem stalowym z wąziutką strefą przejaśnienia brzeżnego lub bez i szerszą strefą zmiętnienia („egg-yolk” — dodatnie). Zauważono również, że przy przesiewach z modyfikacji podłoża Chapmana, zalewanych agarem — ChA i CA, wzrost mikroflory towarzyszącej był o wiele mniejszy, niż bez zalewania.

Na uwagę zasługuje fakt, że wyższą wykry-

walność gronkowców uzyskiwano w podłożach C i CA zawierających zmniejszoną ilość soli, a więc mniej selektywnych niż podłoże Chapmana czy Giolitti-Cantoni. Jest to tym bardziej zastanawiające, że uwidacznia się to szczególnie w tych przypadkach, gdzie zakażenie gronkowcami było małe, liczna natomiast była mikroflora towarzysząca, która mogła wywierać hamujący wpływ na wzrost gronkowców (6, 9, 12, 13). Wynikałoby stąd, że podłoża Giolitti-Cantoni i Chapmana, jakkolwiek bardziej selektywne, są może zbyt toksyczne również i dla samych gronkowców i dlatego lepszymi podłożami namnażającymi, zapewniającymi wyższą wykrywalność okazały się modyfikacje podłoża Chapmana o niższej zawartości soli. Żeby jednak generalnie potwierdzić wyższą wartość tych podłoży, należałoby prowadzić dalsze badania z uwzględnieniem różnych asortymentów żywności oraz większej liczby próbek.

Wnioski

1. W porównaniu wartości podłoży wybiórczo namnażających do wykrywania obecności gronkowców koagulazo-dodatnich w próbach mięsa mielonego, naturalnie i sztucznie zakażonego gronkowcami, największe szanse wyizolowania tych bakterii dają kolejno: płynne podłoże Chapmana z 3% zawartością NaCl zalane po posiewie warstwą agaru, takie samo podłoże nie zalane agarem, podłoże Giolitti-Cantoni oraz oryginalne podłoże Chapmana zalane po posiewie agarem, a następnie podłoże Chapmana nie zalane agarem.

3. Płynne podłoże Chapmana oraz jego modyfikacja z zawartością 3% NaCl dają większe szanse izolacji gronkowców z mięsa mielonego, jeśli podłoża te zalane są po posiewie warstwą agaru.

Piśmiennictwo

1. Baird-Parker A. C.: J. appl. Bact. 25, 12, 1962.
2. Borkowska-Opacka B., Truszczyński M.: Pol. Arch. wet. 16, 709, 1973.
3. Borkowska-Opacka B., Truszczyński M.: Pol. Arch. wet. 16, 719, 1973.

ROBERTS D. H., LUCAS M. H., WIBBERLEY G.: Wpływ temperatury na limfocyty zakażone wirusem białaczki bydła. (Effect of heat on bovine leucosis virus-infected lymphocytes). Br. vet. J. 139, 291—295, 1983 (4).

Wykazanie możliwości zakażenia cieląt wirusem białaczki za pośrednictwem mleka i siary przyczyniło się do podejmowania badań nad sposobami inaktywacji wirusa, zwłaszcza w zakażonych limfocytach. Temperatura krótkotrwałej pasteryzacji inaktywuje wirus występujący w leukocytach mleka. Podanie zakażonych limfocytów działaniu temperatury 50°C przez 70 sekund całkowicie niszczy zakaźność wirusa. Utracie zakaźności towarzyszy śmierć limfocytów.

G.

4. Chapman G. H.: J. Bact. 50, 201, 1945.
5. Giolitti G., Cantoni C.: J. appl. Bact. 29, 395, 1966.
6. Graves R. R., Frazier W. C.: Appl. Microbiol. 11, 513, 1963.
7. ISO/TC/SC-6/WG. Sampling and testing methods of meat and meat products on *S. aureus*. 1971.
8. Kusch D., Reuter G.: Zentbl. Bakt. Parasitkde I 217, 23, 1971.
9. Oberhofer T. R., Frazier W. C.: J. Milk Fd Technol. 24, 172, 1961.
10. Piłszka A., Meinhardt S., Smykal B., Rokoszevska J., Windyga B.: Roczniki PZH 21, 533, 1970.
11. PN-75/A-04024. Produkty żywnościowe. Wykrywanie i ilościowe oznaczanie gronkowców chorobotwórczych (koagulazododatnich). 1975.
12. Troller J. A., Frazier W. C.: Appl. Microbiol. 11, 11, 1963.
13. Troller J. A., Frazier W. C.: Appl. Microbiol. 11, 163, 1963.

Adres autora: mgr Elżbieta Józwik, ul. Puszkina 14/58, 10-295 Olsztyn

Юзьвик Э., Кафель С. — Модификация жидкой питательной среды Чапмена для обнаруживания коагулазоположительных стафилококков в мясе

При изоляции коагулазоположительных стафилококков из рубленого мяса сравнивали величину среды Джолитти-Кантони, среды Чапмена (7,5% NaCl), среды Чапмена, залитой после посева слоем 20 агара (ЧА), среды Чапмена, содержащей 3% NaCl и залитой после посева елоем агара (СА) и среды Чапмена, содержащей 3% NaCl (С). Все среды инкубировались в темп. 37°C 24 часа и просеивались на агар Берд-Царкера. В общем при исследовании мяса, естественно и искусственно зараженного стафилококками, наилучшие результаты получили поочередно при применении следующих сред: СА, С, Джолитти-Кантони, ЧА и Чапмена. Заливание агаром обоих вариантов среды Чапмена увеличило число положительных результатов.

Józwik E., Kafel S. — Modification of a liquid Chapman's medium to detection coagulase-positive staphylococci in meat

The value of different media (Giolitti-Cantoni), Chapman's medium with 7.5% of NaCl, Chapman's medium covered with 2% agar overlay (ChA), Chapman's medium with 3% of NaCl (C), Chapman's medium with 3% of NaCl covered after seeding with agar overlay (CA) were compared during the isolation of coagulase-positive staphylococci from minced meat. All the media were incubated at 37°C for 24 hours and seeded again on Baird-Parker's agar medium. During meat examinations naturally and artificially infected with *Staph. pyogenes* the best findings were obtained using the following consecutive media: CA, C, Giolitti-Cantoni, ChA and Chapman's. Covering Chapman's media with agar overlay increased the number of positive results.

STANIER P., BLACKOMERE D. J.: Stężenie antymonu w surowicy koni. (Antimony concentration in equine serum). Vet. Rec. 113, 157, 1983 (7).

Stężenie antymonu we krwi koni utrzymuje się na stałym poziomie niezależnie od rasy i sposobów żywienia. Wynosi ono u koni pełnej krwi $0,234 \pm 0,0554$ umol/l, u kucyków $0,220 \pm 0,0641$ umol/l, u arabów $0,205 \pm 0,0632$ umol/l. Również nie występują różnice w stężeniu tego pierwiastka u ogierów i klaczy. W surowicy ogierów pełnej krwi poziom antymonu wynosił $0,235 \pm 0,0879$ umol/l, u klaczy $0,232 \pm 0,0402$ umol/l. U koni w wieku jednego roku stężenie antymonu we krwi wynosiło $0,232 \pm 0,0621$ umol/l, u koni w wieku 3 lat $0,238 \pm 0,510$ umol/l.

G.