

EDWARD STEC, STANISŁAW ZALESKI

BADANIA PORÓWNAWCZE NAD ROZWOJEM BAKTERII
ENTEROPATOGENNYCH NA PODŁOŻACH PRZYGOTOWANYCH
Z SERC WOŁOWYCH ORAZ Z DORSZA

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH

Istniejące na całym świecie niedobory mięsa zwierząt rzeźnych skłoniły wiele pracowni mikrobiologicznych do zastąpienia go mniej wartościowym surowcem konsumpcyjnym w postaci serc wołowych. Wprawdzie mogą one być również wykorzystywane dla celów spożywczych, trafiają obecnie w dużej ilości do przerobu dla celów laboratoryjnych.

W wielu krajach łatwo dostępnym surowcem mięsnym jest mięso ryb chudych, a w szczególności dorsza. Dane wynikające z piśmiennictwa wskazują, że skład chemiczny mięsa zwierząt rzeźnych nie różni się w sposób istotny od składu chemicznego mięsa ryb chudych (1—3).

Z powyższych przyczyn postanowiono zbadać czy można zastąpić wyciąg z serc wołowych wyciągiem z tkanki mięsnej dorsza do przygotowania różnego rodzaju podłoży mikrobiologicznych namnażających i wybiórzych. Badania ograniczono jedynie do drobnoustrojów enteropatogennych.

MATERIAŁ I METODYKA

S z e z e p y. Jako diagnostyczne szczepy zastosowano: *Escherichia coli* typ serologiczny 0 111 : B₄ (Muz. PZH 305/52); *Salmonella paratyphi B* (Muz. PZH 395/33); *Shigella flexneri* (Muz. PZH 285/50); *Staphylococcus aureus* (wyhodowany w Zakładzie Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH z zatrucia pokarmowego) i *Clostridium perfringens* — wysoce ciepłoporna odmiana typu A (wysobniona z zatrucia pokarmowego w Zakładzie Badania Żywności i Przedmiotów Użytku PZH).

Podłoża. Badania przeprowadzono na następujących grupach podłoży:

1) same wyciągi; 2) buliony; 3) agar odżywczy zawierający 1¹/₂% agaru; 4) niektóre podłoża wybiórcze.

Powyższe podłoża przygotowywano tak na wyciągach z serca wołowego jak i na wyciągach z tkanki mięsnej dorsza, przy czym wyciągi sporządzano w sposób jednakowy zgodnie z ujednoliconą standartową metodą PZH (4).

Surowiec (ryby i serca) pochodził z trzech pór roku — wiosny, lata i jesieni. W poszczególnych porach roku wyciągi z serc i z dorsza sporządzano równolegle, używając stale świeżych surowców.

METODYKA BADAŃ

a) Na podłożach płynnych. Szczepy bakterii uprzednio kilkakrotnie pasażowano przesiewając w odstępach 24-godzinnych na świeży bulion. Po 10-godzinnej inkubacji w temp. 37° hodowle bulionowe wirowano

i osad przemywano roztworem fizjologicznym NaCl. Otrzymane osady zawieszano w płynie fizjologicznym NaCl odpowiadającym objętościowo ilości odwirowanego podłoża, po czym równomierną zawiesinę bakterii rozcieńczano 1 : 100. Do rozlanych miarowo po 5 ml poszczególnych podłoży wprowadzano 0,1 ml przygotowanej zawiesiny i posiewy umieszczano w cieplarni o temp. 37° na 6, 12 i 18 godzin. Celem uniknięcia zmian ilościowych w hodowli bakteryjnej w czasie od wyjęcia jej z cieplarki do wykonania oznaczenia hodowle te bezpośrednio po wyjęciu z cieplarki podgrzewano do temp. 100°.

Do wykonywania pomiarów gęstości optycznej używano równoległych hodowli na podłożach z tkanki mięsnej dorsza i serc wołowych, przy czym tak jedne jak i drugie, po podgrzaniu do temp. 100° rozcieńczano wodą destylowaną w stosunku 1 : 4, a następnie dokładnie mieszano. W celach kontrolnych określano gęstość optyczną płynu z odwirowanych równoległych hodowli na tych samych podłożach, przy czym płyn badany rozcieńczano również wodą destylowaną w stosunku 1 : 4.

Gęstość optyczną oznaczano na elektrofotometrze Fishera. Wyniki dla poszczególnych hodowli otrzymywano przez odjęcie procentu pochłoniętego światła przez podłoże po odwirowaniu bakterii, od procentu światła pochłoniętego przez pełną hodowlę na tym podłożu.

Zastosowane podłoża były różne dla poszczególnych drobnoustrojów:

Escherichia coli, *Salmonella* i *Shigella* posiewano na wyciągi i buliony zwykłe, dla *Staphylococcus aureus* używano wyciągów bulionów zwykłych i podłoży płynnych Chapmana.

b) Na podłożach stałych. Przepasażowane szczepy bakteryjne posiewano na powierzchni podłoża w sposób umożliwiający swobodny wzrost pojedynczych kolonii. W przypadku *Clostridium perfringens* posiewano odpowiednio na podłoże Wilson-Blaira. Posiewy termostatowano w temp. 37° przez 18 lub 42 godziny, a następnie porównywano optycznie wielkość kolonii na podłożach z wyciągiem sercowym i dorszowym.

Zastosowano następujące podłoża dla poszczególnych drobnoustrojów:

Escherichia coli, *Salmonella* i *Shigella* — agar zwykły, agar z dodatkiem 1% glikozy i podłoże Endo.

Staphylococcus aureus — agar zwykły, agar z dodatkiem 1% glikozy, podłoże stałe Chapmana i agar z dodatkiem 5% krwi baraniej.

Clostridium perfringens — podłoże Wilson — Blaira dla beztlenowców.

WYNIKI BADAŃ

a) P o d ł o ż a p ł y n n e. Obfitość wzrostu określano nefelometrycznie; tym samym więc liczebność populacji bakteryjnej oznaczano w liczbach bezwzględnych. Dało to możliwość dokonania porównania nie tylko w poszczególnych porach roku między podłożem na wyciągu sercowym i dorszowym, lecz również zaistniała możliwość dokonania innych porównań. Dzięki tej metodzie można było ocenić wartość samych wyciągów sercowych jak i rybnych na przestrzeni całego roku tak między sobą, jak i pomiędzy nimi. Można było również dokonywać porównań między różnymi podłożami.

Celem wyeliminowania wyników przypadkowych każde oznaczenie wykonywano trzykrotnie z trzech równoległych posiewów; wyniki podano w postaci średniej arytmetycznej. W przypadku uzyskania wyników o zbyt dużym rozrzucie oznaczenia powtarzano.

Uzyskane wyniki ujęto w tabeli I.

Tabela I

Stopień zmętnienia podłoża płynnych w czasie wzrostu drobnoustrojów (wyrażony w procentach światła pochłoniętego przez komórki)

Szczep	Czas wzrostu w godzinach	Wyciąg								Bulion								Podłoże Chapmana							
		wiosna		lato		jesień		średnia		wiosna		lato		jesień		średnia		wiosna		lato		jesień		średnia	
		dorsz	serce	dorsz	serce	dorsz	serce	dorsz	serce	dorsz	serce	dorsz	serce	dorsz	serce	dorsz	serce	dorsz	serce	dorsz	serce	dorsz	serce	dorsz	serce
<i>Escherichia coli</i> 0 111: B ₁	6	5,0	4,0	2,9	5,0	2,5	4,5	3,47	4,5	7,0	6,3	5,0	7,0	6,0	7,5	6,3	6,9								
	12	10,0	9,0	3,5	6,2	3,0	5,5	5,5	6,9	11,3	7,7	6,5	8,5	7,0	8,0	8,3	8,1								
	18	13,5	9,3	4,5	8,0	4,3	6,5	7,4	7,9	15,2	9,5	7,0	9,0	8,0	9,0	10,1	9,2								
<i>Salmonella</i> <i>paratyphi</i> B	6	5,5	4,5	3,0	5,0	2,8	3,0	3,8	4,2	7,35	6,5	6,5	7,0	6,5	8,5	8,8	7,3								
	12	12,0	5,0	5,0	6,0	5,0	7,0	7,3	6,0	16,6	9,2	7,0	10,5	7,5	9,0	10,4	9,2								
	18	15,5	8,8	5,5	7,8	6,0	8,5	9,0	8,4	17,7	10,0	7,5	15,0	9,0	10,0	11,4	11,8								
<i>Shigella flexneri</i>	6			1,8	3,5	1,8	1,6	1,8	2,5			4,0	6,8	4,0	6,0	4,0	6,3								
	12			3,0	4,0	3,0	3,5	3,0	3,7			5,5	9,0	7,0	7,5	6,2	8,2								
	18			4,3	4,5	3,0	3,5	3,6	4,0			6,5	10,0	7,3	7,5	6,9	8,7								
<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>	6	8,8	6,5	2,8	3,3	2,8	2,3	4,8	4,0	9,5	7,0	3,0	3,8	2,5	2,8	5,0	3,5	2,3	2,0	3,5	4,0	1,8	2,0	2,5	2,7
	12	13,5	8,8	4,0	6,5	4,3	5,8	7,3	7,0	13,4	10,6	8,5	10,5	7,0	8,0	9,6	9,7	3,0	2,3	6,3	7,0	3,5	4,5	4,3	4,6
	18	18,6	11,6	4,5	9,0	5,3	6,5	9,5	9,1	19,6	11,9	9,5	16,0	8,0	10,9	12,4	12,6	5,5	4,6	9,0	8,6	6,3	8,0	6,9	7,0

Jak wynika z tabeli I, niezależnie od rodzaju bakterii oraz użytego podłoża płynnego przygotowanego z połowu wiosennego, uzyskano zdecydowanie obfitszy wzrost tak po 6, jak i 12 oraz 18 godzinach hodowli na wyciągu dorszowym i podłożach na nim przygotowanych. W pozostałych porach roku korzystniejsze wyniki uzyskiwano na podłożach z serc wołowych.

Obserwując jednak zachowanie się poszczególnych bakterii na tych samych podłożach przygotowanych w różnych okresach roku można stwierdzić, że w poszczególnych porach roku występują wydatne różnice. I tak np. absorpcja światła wywołana przez komórki *Staphylococcus aureus* po 18 godzinach hodowli na wyciągu z serc wołowych wynosiła na wiosnę 11,7%, w lecie 9,0%, a na jesieni tylko 6,5%. Podobne zjawisko niejednolitego namnażania bakterii obserwuje się również u innych rodzajów niezależnie od użytego wyciągu i rodzaju podłoża.

Z tych przyczyn wskazane było określenie średniej absorpcji światła dla każdego poszczególnego podłoża i gatunku bakteryjnego, ponieważ daje ona możliwość porównania wartości podłoży na wyciągach dorszowych i sercowych. W tym celu obliczoną przeciętną wartość dla całego roku umieszczono w kolumnie średnia roczna w tabeli I. Wynika z niej, że w przekroju rocznym wartość podłoży na wyciągach dorszowych nie różni się w sposób zasadniczy od wartości podłoży na wyciągach sercowych. Opierając się na wzroście bakterii na samych wyciągach można przypuszczać, że w przypadku *Salmonella paratyphi B* oraz *Staphylococcus aureus* nieco korzystniejszą pożywką jest wyciąg rybny, natomiast w przypadku *Escherichia coli* 0 111 : B₄ oraz *Shigella flexneri* wyciąg z serca.

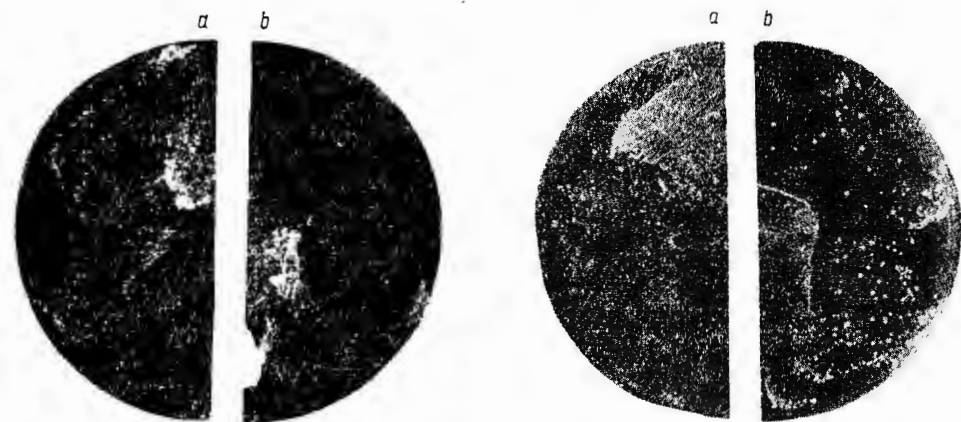
b) **Podłoża stałe.** Oceniając porównawczo na podłożach stałych kolonie posiewanych szczepów należy stwierdzić, że przy posiewach równoległych nie stwierdzono różnic w wyglądzie kolonii *Escherichia coli* 0 111 : B₄, *Salmonella paratyphi B* i *Clostridium perfringens*. Wzrost *Shigella flexneri* był stale nieco lepszy na podłożach sporządzonych na wyciągu z serc wołowych (ryc. 4), natomiast *Staphylococcus aureus*, niezależnie od użytego podłoża, stale rósł lepiej na podłożach sporządzonych na wyciągach z tkanki mięsnej dorsza (ryc. 1—3).



Ryc. 1. 18-godz. hodowla *Staph. aureus* na agarze odżywczym przygotowanym: a) na wyciągu z dorsza, b) na wyciągu z serc wołowych

Ryc. 2. 18-godz. hodowla *Staph. aureus* na agarze odżywczym z dodatkiem 1% glikozy przygotowanym: a) na wyciągu z dorsza, b) na wyciągu z serc wołowych.

Szczególnie istotne znaczenie może to posiadać w przypadku stosowania podłoża stałego Chapmana, na którym po 18 godzinach kolonie gronkowca są bardzo drobne i słabo wykształcone, co powoduje konieczność dalszego termostatowania posiewu przez następne 24 godziny. Na podłożu stałym Chapmana, przygotowanym na wyciągu z tkanki mięsnej dorsza, już po 18 godzinach kolonie tej bakterii są bardzo dobrze wykształcone i łatwe do pobierania (ryc. 4).



Ryc. 3. 18-godz. hodowla *Staph. aureus* na podłożu Chapmana przygotowanym: a) na wyciągu z dorsza, b) na wyciągu z serc owlowych

Ryc. 4. 18-godz. hodowla *Shigella flexneri* na agarze odżywczym z dodatkiem 1% glikozy przygotowanym: a) na wyciągu z dorsza, b) na wyciągu z serc wołowych

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Różnice, istniejące w budowie chemicznej tkanki mięsnej dorsza i serc wołowych, nie mają istotnego znaczenia dla wzrostu takich drobnoustrojów jak *Escherichia coli* 0 111::B₄, *Salmonella paratyphi* B i wysoce ciepłopornej odmiany typu A *Clostridium perfringens*.

Drobnoustrojem, dla którego wyciąg tkanki mięsnej dorsza okazał się środowiskiem dogodniejszym, jest *Staphylococcus aureus*. Jego intensywniejszy i wydatniejszy rozwój, szczególnie na podłożach z połowu wiosennego, może rzucić ciekawe światło na zagadnienie rybnych zatruc pokarmowych. Wiadomo, że szczególnie często po spożyciu ryb występują zatrucia wywołane tą bakterią (5). Zjawisko to może być tłumaczone specyficznymi warunkami przetwórstwa rybnego oraz wyjątkową wytrzymałością tej bakterii w środowiskach o wysokim stężeniu chlorku sodowego (6). Być może jednak, że przyczyna powyższego leży przede wszystkim w sprzyjającym dla gronkowca, szczególnie w okresie wiosennym, składzie chemicznym tkanki mięsnej dorsza. Jeżeli bowiem równolegle ze zdolnościami rozwojowymi tej bakterii w tkance dorszowej idzie jej zdolność produkcyjna enterotoksyny, wtedy przyczynę będzie można uznać za ustaloną.

Słabiej na podłożach przygotowanych na wyciągu z tkanki mięsnej dorsza rozwijała się *Shigella flexneri*. Nie będzie to stanowiło jednak specjalnej niespodzianki, jeżeli weźmie się pod uwagę, że drobnoustroje

tego rodzaju rozwijają się dość trudno i wolno na szeregu podłoży i wymagają szczególnie dogodnych warunków dla swej wegetacji.

Ujmując zjawisko ogólnie, wydaje się, że w odniesieniu do hodowli *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Staphylococcus* można z powodzeniem zastosować wyciąg z tkanki mięsnej dorsza zamiast wyciągu z serc wołowych. Powyższe twierdzenie można uznać za uzasadnione, stwierdzając istnienie podobnych wahań w wartości odżywczej podłoży na wyciągach z serc, jak i z dorsza, w rezultacie których przeciętna roczna wartość podłoża staje się podobna.

WNIOSKI

1. Porównano zdolności rozwojowe poszczególnych drobnoustrojów enteropatogennych na wyciągu z tkanki mięsnej dorsza i z serc wołowych oraz na podłożach na nich przygotowanych.

- a) Nie stwierdzono istotnych różnic w rozwoju *Escherichia coli* typu serologicznego 0 111 : B₄ i wysoce ciepłopornej odmiany typu A *Clostridium perfringens* — przy użyciu obu rodzajów wyciągów i podłoży na nich przygotowanych.
- b) *Staphylococcus aureus* rozwija się nieco lepiej na podłożach przygotowanych na wyciągu z tkanki mięsnej dorsza, szczególnie z połowów w okresie wiosennym.
- c) *Shigella flexneri* rozwija się lepiej na wyciągu z serc wołowych.

2. Ze względu na niewielkie różnice w intensywności wzrostu badanych bakterii na podłożach sporządzonych z tkanki mięsnej dorsza i z serc wołowych jest możliwe zastąpienie podłoży na wyciągu z serc wołowych — podłożami na wyciągu z tkanki mięsnej dorsza świeżego.

Э. С т е ц, С. З а л е с к и

СПРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ НАД РАЗВИТИЕМ ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ НА СРЕДАХ ПРИГОТОВЛЕННЫХ ИЗ ВОЛОВЫХ СЕРДЕЦ И МЯСА ТРЕСКИ

С о д е р ж а н и е

Авторы сравнивали прогрессивную способность развития *Escherichia coli* O111 : B₄, *Salmonella paratyphi* B., *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* и *Clostridium perfringens* штамм А на мясной вытяжке трески и воловых сердец, а также на средах из них приготовленных. Сырьё (рыбы и сердца) происходили из трех времен года — весна, лето и осень. Основываясь на полученных результатах: 1) не замечено существенной разницы в развитии *Escherichia coli* O111 : B₄ и теплоупорного штамма А *Clostridium perfringens* при употреблении обеих вытяжек и сред на них приготовленных; 2) *Staphylococcus aureus* развивается немного лучше на средах приготовленных на вытяжке из мяса трески, особенно весеннего улова; 3) *Shigella flexneri*, развивается немного лучше на вытяжке из воловых сердец; 4) в виду того что были очень небольшие разницы в интенсивности возраста исследуемых бактерий в средах приготовленных из мяса трески и воловых сердец — существует полная возможность заместить среды на вытяжках из воловых сердец — средами на вытяжках из мяса свежей трески.

E. Stec, S. Zaleski

COMPARATIVE STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF
ENTHEROPATHOGENIC BACTERIA ON MEDIA PREPARED FROM
OX HEARTS AND FROM CODLING

Summary

The developmental abilities of *Escherichia coli* 0 111:B₄, *Salmonella paratyphi* B, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens* type A were compared on the extract from muscular tissue of codling and from ox hearts and on the media prepared from the said extract. The raw material (fish and hearts) came from three seasons — spring, summer and autumn. On the basis of the results obtained there were found: 1) no essential differences in the development of *Escherichia coli* 0 111:B₄ and the highly thermo-resistant variety of type A *Clostridium perfringens* — when employing both types of extracts and media prepared from them; 2) *Staphylococcus aureus* grows a little better on the media prepared from the extract of muscular tissue of codling particularly from the spring catch; 3) *Shigella flexneri* grows better on the extract from ox hearts; 4) due to small differences in the intensity of growth of the bacteria in question on the media prepared from muscular tissue of codling and from ox hearts it is possible to substitute the media prepared from the extract of ox hearts by media prepared from the extract of muscular tissue of fresh codling.

PIŚMIENNICTWO

1. *Shewan J. M.*: The Biochemistry of Fish. Biochemical Society Symposia nr 6, University Press Cambridge, 1951. — 2. *Causseret J.*: Congres International d'Etude sur le Rôle du Poisson dans l'Alimentation, Paris, 1950. — 3. *Jacquist R., Creach A. P. V.*: Congres International d'Etude sur le Rôle du Poisson dans l'Alimentation, Paris, 1950. — 4. *Jańczura E., Załęska H., Teisseyre T.*: Standaryzacja podłoż, Warszawa 1953. — 5. *Turzecki K. J.*: Gig. i Sanit., 4, 31, 1949. — 6. *Fanaraceus A.*: Acta Pathol., 26, 655, 1949.