

niach, tak na ludziach-ochotnikach jak i na zwierzętach doświadczalnych, którym podawano *per os* kultury bakteryjne lub też filtry *Cl. perfringens*, wyosobnionych z przypadków zatruc, nie zdołano wywołać typowych objawów chorobowych. Do zatruc pokarmowych dochodziło jedynie wówczas kiedy ochotnicy spożywali potrawy mięsne w których miał miejsce aktywny wzrost *Cl. perfringens*.

W tej chwili jedyną do przyjęcia interpretacją mechanizmu zatruc podał Nygren (55). Według niej obecna w żywności lecytyna ulega hydrolizie pod wpływem fosfolipazy C (lecytynazy) z wytworzeniem jako produktu fosforylcholino. Substancja ta jest w stanie, jak to potwierdzono w doświadczeniach na zwierzętach laboratoryjnych, wywołać w 8—12 godzin po podaniu *per os* biegunki oraz zespół charakterystycznych objawów chorobowych. Produkowana przez *Cl. perfringens* toksyna alfa jest chemicznie lecytynazą (fosfolipazą C), którą wytwarza m. in. także i *Bac. cereus*.

Kliniczne objawy zatrucia pokarmowego na tle *Cl. perfringens* występują z reguły po 8—24 godz. i charakteryzują się zwykle biegunką, bólami brzucha i nudnościami. Stwierdzono pewne różnice w obrazie klinicznym w zależności od typu drobnoustroju. Zatrucia wywołane przez typ A, podtyp 2 przebiegają na ogół łagodniej, bez wymiotów, podwyższonej temperatury i bólów głowy, wygasają po 24 godz., a zejścia śmiertelne są bardzo rzadko notowane i dotyczą jedynie osób starych lub wyniszczonych. Obserwacja (15) epidemii zatrucia wywołanego przez wymieniony typ u 110 studentów wykazały następujące objawy kliniczne: biegunka — 90 osób, bóle brzucha

— 83, bóle głowy — 44, nudności — 36, gorączka — 9, kał z domieszką krwi — 8, wymioty — 7.

Zatrucia pokarmowe wywołane przez typ C, podtyp 4 charakteryzują się o wiele bardziej ostrymi objawami. Schorzenie rozpoczyna się gwałtownymi bólami brzucha i wymiotami a następnie dochodzi do silnej biegunki z podwyższeniem temperatury. Zejścia śmiertelne są dużo częstsze i wg Zeisslera i Rassfeld-Sternberga (88) kształtują się nawet w granicach 33% przypadków.

Stosunkowo długi okres inkubacji zatrucia na tle *Cl. perfringens* sugeruje działanie czynnika chorobowego na jelita grube, w których stwierdza się przede wszystkim zmiany chorobowe.

Przedstawione dane na temat mechanizmu oraz przebiegu zatruc pokarmowych wywołanych przez *Cl. perfringens* zawierają jeszcze szereg niejasności. Pozwalają one jednak na stwierdzenie, że dla wystąpienia schorzenia istotną rolę odgrywa nie sama tylko obecność *Cl. perfringens* w środku spożywczym ale jego poważne namnożenie ilościowe. Istotnym jest również, że tego rodzaju wzrost ilościowy *Cl. perfringens* możliwy jest jedynie w następstwie zabiegów termicznych. W surowych produktach, przypuszczalnie ze względu na antagonizm mikroflory towarzyszącej, nie dochodzi nigdy do tak poważnego wzrostu ilościowego, mimo częstego występowania *Cl. perfringens* w żywności.

Piśmiennictwo, obejmujące 89 pozycji, znajduje się u autorów.

Adres autorów: Lublin, ul. Akademicka 11.

CELESTYN SZCZUCKI

Łódź

## Nowa „bibułowa” metoda mikrobiologicznych badań ilościowych mięsa i przetworów mięsnych

Podstawą kwalifikowania jakości mikrobiologicznej mięsa i przetworów są wyniki badań zarówno jakościowych jak i ilościowych. Szczególnie te ostatnie winny odgrywać w ocenie zasadniczą rolę, bowiem poza bardzo nielicznymi przypadkami występowania mikroflory chorobotwórczej, we wszystkich pozostałych podstawą wnioskowania i decyzji może być nie sam fakt obecności mikroflory saprofitycznej czy nawet warunkowo-chorobotwórczej, a stopień zakażenia produktu tą mikroflorą.

Ogólny stan sanitarny, świeżość, potencjalne zagrożenie trwałości czy nawet zdrowotności jest funkcją sumy przemian metabolicznych, których praktycznym wyrazem jest liczebność mikroflory. W takiej sytuacji zakres i często-

ściwość a więc operatywność kontroli rutynowej prowadzonej przez laboratoria WIS, przemysłowe czy służby San.-Epid. zależy od prostoty i przystępności obowiązującej metodyki, a podstawność lub rzeczowość interpretacji — od dokładności i precyzji stosowanych metod.

W tym zakresie obserwuje się od szeregu lat stagnację jeśli nie wyraźny impas koncepcyjny. Wyrazem tego jest np. obowiązująca metodyka \*), która obok pracochłonnej homogenizacji mechanicznej materiału i posiewu płytkowego z licznych rozcieńczeń, dopuszcza jako „orientacyjną” metodę posiewu odciskowego. Jest ona wprawdzie kapitalnie prosta,

\* (PN — 66/A — 82054 — Mięso i przetwory mięsne. Badania bakteriologiczne).

ale w zakresie ilościowania mikroflory zupełnie bezprzedmiotowa. Pracochłonność metody klasycznej, ogranicza stosowanie jej w kontroli rutynowej na rzecz metody odciskowej. Z kolei umowność i niepowtarzalność tej ostatniej deprecjonuje (lub wręcz dyskwalifikuje) merytoryczną podstawność wydawanych orzeczeń i podejmowanych decyzji.

Rozwiązanie problemu leży niewątpliwie w poszukiwaniu nowych metod badań ilościowych, dostosowanych prostotą do potrzeb rutynowanej kontroli a równocześnie dokładnością i precyzją do społecznego i gospodarczego ciężaru decyzji, podejmowanych w przypadku negatywnych wyników tych badań.

Opisana w niniejszym artykule metoda „bibułowia” spełnia zadawalająco oba postawione wyżej wymogi. Opatentowana w roku 1960 za Nr 43437, stosowana była eksperymentalnie w pracowni bakteriologicznej Rejonowego Laboratorium Kontrolno-Badawczego przemysłu mięsnego w Łodzi przez wiele lat.

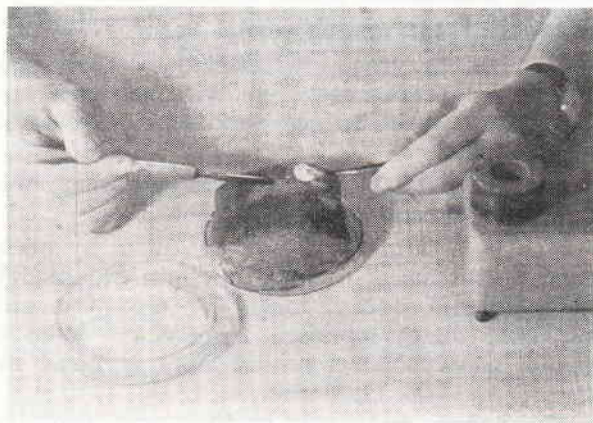
Wyniki tysięcy posiewów i badań porównawczych, przeprowadzanych na licznych asortymentach mięsa i przetworów dowodzą, że całkowicie zdała ona praktyczny egzamin.

### Metody

Poprzedzająca wszelkie badania ilościowe mechaniczna (czy nawet ręczna) homogenizacja produktów mięsnych nastęcza powszechnie znane trudności. Szukając dróg ich rozwiązania, zastąpiono lej homogenizatora probówką z upłynnionym agarem, zaś napęd osiowy mieszadła — wirującym polem magnetycznym. Zważywszy, że pole to jest za słabe do rozbicia tkanki mięsnej ograniczono próbkę jedynie do soku mięsnego (bez tkanki), wchłoniętego ilościowo w standardowy sączek bibułowy. Uzyskano w ten sposób układ bakteriologicznie zamknięty, a ilość szkła i sprzętu ograniczono do nieuniknionego minimum.

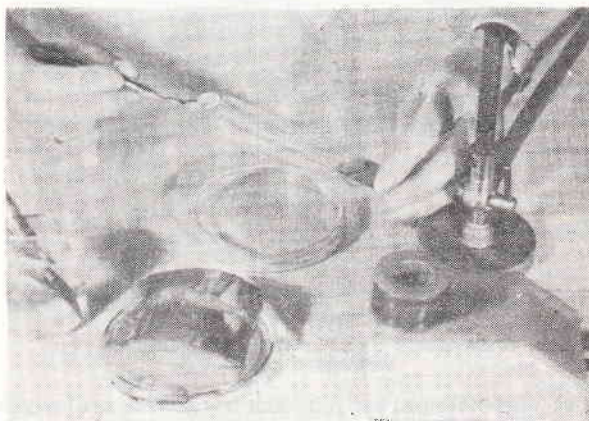
Zasada metody polega więc na:

a) ilościowym pobraniu soku badanego produktu przy pomocy sączka bibułowego (fot. 1),



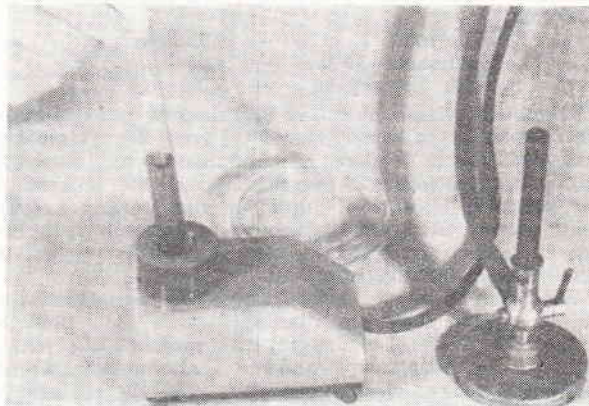
Fot. 1. Ilościowe pobranie materiału (soku mięsnego) do posiewu

b) przeniesieniu nasiąkniętego sączka wprost do probówki z roztopionym agarem (fot. 2),



Fot. 2. Przeniesienie materiału wprost do upłynnionego podłoża agarowego

c) homogenizacji bibuły wrzuconym do probówki mieszadłem, napędzanym przez wirujące pod probówką pole magnetyczne (fot. 3),



Fot. 3. Homogenizacja w układzie bakteriologicznie zamkniętym

d) wylania agaru z rozbitym na włókna sączkiem na płytkę Petriego,

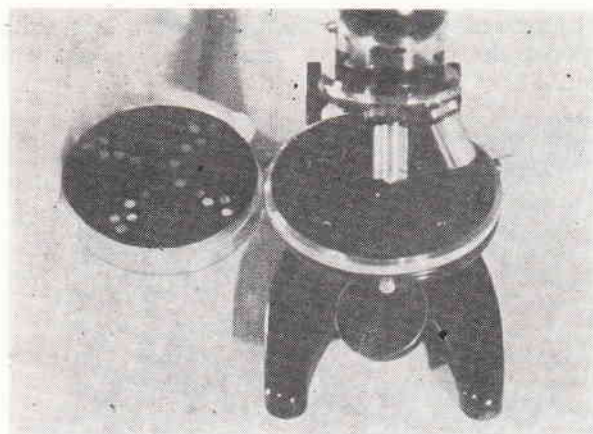
e) po normalnej inkubacji, liczeniu gęstych na ogół wysiewów pod mikroskopem, przy użyciu prostego szablonika, zapewniającego losowość i reprezentatywność pól widzenia (fot. 4).

Przy seryjnej i zorganizowanej pracy można w ciągu godziny wykonać w ten sposób około 20 posiewów (czynności wymienionych w pkt. a) do d).

Metoda pozwala także na prowadzenie homogenizacji w warunkach beztlenowych (pod warstwą parafiny płynnej) oraz na mieszanie rozcieńczeń do posiewów metodami klasycznymi.

### Przygotowanie standardowych sączków

Właściwościami bibuły, odgrywającymi w opisywanej metodzie istotną rolę są: chłonność, wyrównana pojemność kapilarna i łatwość rozbicia na włókienka. Badania przeprowadzone na kilku rodzajach



Fot. 4. Szablonik do mikroskopowego liczenia gęsto wysianych płytek

bibuł chromatograficznych oraz zwykłych krajowych filtracyjnych wykazały praktyczną przydatność wszystkich z tym, że znormalizowane bibuły chromatograficzne odznaczają się bardziej wyrównaną chłonnością, są jednak nieco trudniejsze do rozbicia.

Z jednorodnej partii bibuły (z jednej ryzy) wycinamy sączki jednakowej wielkości i wkładając je na kilka minut w przekroje mięsa lub przetworów, wagowo ustalamy przeciętną chłonność w mg soku/cm<sup>2</sup> bibuły. Dla przykładu, dla paru bibuł wynosi ona:

Whatman 2	— 15,0 mg/cm <sup>2</sup>
Schleicher 2040	— 14,8 „
kraj. filtracyjna	— 9,8 „

Rzecz oczywista chłonność ta zależy w pewnej mierze od soczystości produktu. Z tej racji korzystniejsze jest podzielenie badanych produktów na soczyste (których przekrój przy ucisku zwilża się sokiem) i nie soczyste, ustalając chłonność dla każdej z tych grup osobno. Raz przebadana w ten sposób ryza bibuły stanowi praktycznie niewyczerpalny zapas na wiele lat codziennych badań.

Wielkość sączków jest praktycznie ograniczona z jednej strony swobodą manipulowania (np. uchwyceniem w pincetę) z drugiej zaś możliwością zmieszania ich luźno w probówce i zhomogenizowania w 10 ml agaru. Najwygodniejszy wydaje się sączek o powierzchni odpowiadającej chłonności 10—20 mg soku (rozcieńczenie 1:100 lub 2:100).

Kształt sączków jest w zasadzie obojętny. Najwygodniejszy do wycięcia (np. korkoborem) jest kształt okrągły, tym niemniej w niektórych przypadkach badania produktów o nierównomiernym rozkładzie zakażenia można stosować także i wąskie paski (sięgające np. od powierzchni do centrum termicznego bloku konserwy). Ten sam efekt uśrednienia obrazu przekroju osiągnąć można stosując kilka mniejszych sączków.

Sporządzenie sączków przy pomocy odpowiedniej wielkości korkobora, dziurkacza czy innych prostych przyrządów powinno zapewnić ich powtarzalną wielkość (pojemność).

Nie zaleca się sterylizowania pociętych sączków w gorącym powietrzu ze względu na „filcowanie” bibuły co utrudnia jej późniejsze rozbicie. Zupełnie wystarczające jest zalanie 60—70% alkoholem i wysuszenie.

Tak sporządzone sączki pozwalają pobierać ilościowo materiał płynny niemniej dokładnie niż uznanymi klasycznymi sposobami. Dla przykładu przytaczamy wyniki odmierzeń:

- 1 ml pipetą z podziałką, z której odmierzano 0,1 ml
- mikropipetą automatyczną 0,1 ml
- eżą kalibrowaną na 0,01 ml
- sączkami  $\phi$  12,1 mm z bib. Schleicher 2040, o chłonności ustalonej na 0,02 ml

Tab. 1

Metoda	Pipeta z podziałką 0,1 ml	Mikropipeta automatyczna 0,1 ml	Eża kalibrowana 0,01 ml	Sączki 0,02 ml
Charakterystyka				
Dokładność (jako średnia z 25 odmierzeń w ml)	0,0994	0,0991	0,0099	0,0206
Precyzja (jako odchylenie standardowe w % względem średniej)	13,25%	2,71%	21,10%	11,26%

Jak widać sączki ustępują precyzją jedynie automatycznej mikropipecie kapilarnej ze stałym skokiem rzęciowego tłoczka.

Pobieranie materiału do posiewów.

Oстрым jałowym nożem lub skalpelem wykonujemy nacięcie badanego mięsa lub przetworu (w miarę możliwości w poprzek włókienek). W powstałą szczelinę (lub przekrój) wkładamy pincetą sączek, a brzegi przekroju zwieramy i lekko dociskamy, by zapewnić obustronne przyłgnięcie bibuły do powierzchni przeciętych mięśni. Przesadnie silny docisk ogranicza chłonność bibuły. W przypadku badania produktów o zakażeniu niejednorodnym (gniazdowym) korzystne jest włożenie sączka do uprzednio zmielonej na maszynce i wymieszanej masy. Ten nieco bardziej pracochłonny sposób jest szczególnie godny polecenia przy równoczesnych chemicznych i mikrobiologicznych badaniach, które można przeprowadzić na jednej próbce pod warunkiem uprzedniego wyjałowienia maszynki do mięsa.

Sok mięsny wraz ze znajdującymi się w nim bakteriami wnika do przestrzeni kapilarnych bibuły aż do stanu równowagi, która ustala się najdalej po paru minutach, zależnie od soczystości produktu.

Nasiąknięte sączki przenosi się następnie do probówki z upłynnionym agarem i homogenizuje. Pobierając seryjne próby zdala od laboratorium, można wyeksponowane sączki wrzucać do pustych probówek (i zalewać agarem dopiero w laboratorium), lub np. nakłute na szpilki wbijać w warstwę parafiny w zamkniętym naczyniu. Nawet obeschnięcie sączków nie wpływa na wyniki posiewów. Na dowód przytaczamy wyniki posiewów 20 sączków z zawiesiną bakterii z których 10 homogenizowano od razu, a 10 po wysuszeniu i dwugodzinnym przechowywaniu.

sączki wilgotne	68,614 bakt/ml zawiesiny
„ suszone	69,020 „ „

Jest to bardzo wygodne przy badaniu prowadzonym w hali produkcyjnej lub magazynie, bowiem nie wymaga przenoszenia próbek do laboratorium.

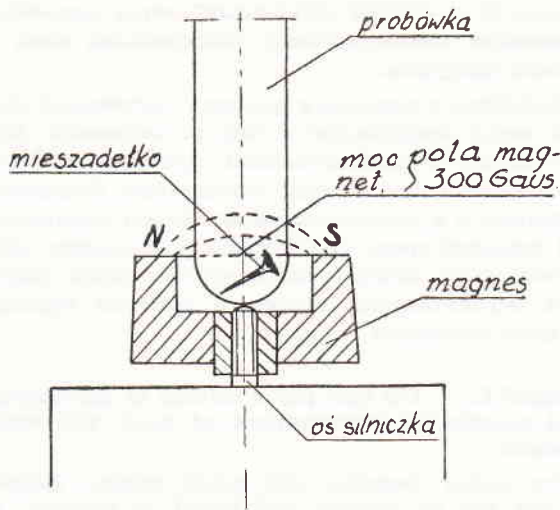
Homogenizator magnetyczny.

Jest to przyrząd wytwarzający pod probówką z agarem i sączkiem wirujące pole magnetyczne, poruszające wrzucone do agaru mieszadełko.

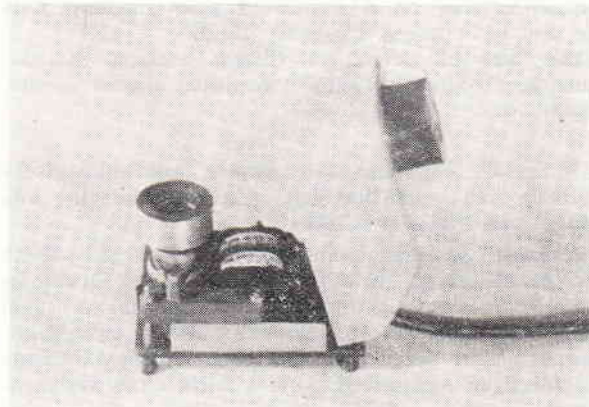
Kształt pola winien obejmować dno probówki w sposób podany na fot. 5.

Moc pola winna być na tyle duża, by obracane z szybkością ca 3000 obr/min. mieszadełko pokonało opory tarcia w cieczy o stosunkowo dużej lepkości. Praktycznie moc ta winna na wysokości mieszadełka wynosić nie mniej niż 300 Gaussów.

Do badań własnych zastosowano prototyp homogenizatora przedstawiony na fot. 6.



Fot. 5. Dno próbki z mieszadłem w wirującym polu magnetycznym



Fot. 6. Prototyp homogenizatora magnetycznego z uchyloną obudową

Jego magnes odlany ze stopu Anko III hartowany był w silnym polu magnetycznym i po ostygnięciu domagnesowany. Pomiar indukcji magnetycznej w powietrzu wykazał 540 Gaussów na wysokości mieszadła. Magnes osadzony jest na popularnym silniczku adapterowym krajowej produkcji. Ciężar całego homogenizatora z obudową winidurową i sznurkiem — 950 gramów.

Mieszadłko magnetyczne winno być powtarzalne i ostre. Spośród różnych przebadanych materiałów najkorzystniejsze okazały się gwoźdźki tapicerskie.

Homogenizacja.

Do próbki z agarem i mieszadłem magnetycznym wprowadzamy nasiąknięty sączek. Zamkniętą próbkę ustawiamy na homogenizatorze tak, by wirujące pole objęło dno próbki i mieszadłko, które rozprasa bibułę na włókienka. Wyplukanie bakterii z sączka następuje przed jego rozbiciem, co łatwo sprawdzić mikroskopując po inkubacji na płytce pozostałe ewentualnie strzępki bibuły.

Czas homogenizacji nie przekracza 60 sek. Dla przykładu podajemy średnie wyniki z 10

równoległych powtórzeń homogenizacji sączków z zawiesiną enterokoków ( $10^7/\text{ml}$ ):

Homogenizacja 10 sek. —  $1,09 \cdot 10^7$

Homogenizacja 30 sek. —  $1,11 \cdot 10^7$

Homogenizacja 180 sek. —  $1,04 \cdot 10^7$

W przypadku jeżeli słupki agaru w próbce jest za niski, może w nim powstawać wirujący lej, powodujący napowietrzanie podłoża, co może mieć znaczenie przy homogenizacji beztlenowej. Właściwy stosunek wysokości słupka do średnicy próbki oraz jej nieco ukośne ustawienie na homogenizatorze eliminuje tę niedokładność.

Posiewy i inkubacja.

Nie różnią się one od tradycyjnych z tym wyjątkiem, że ograniczona wielkość (pojemność) sączków pozwala na wysianie co najwyżej dwu kolejnych rozcieńczeń jeśli nie liczyć wariantu metody, w którym homogenizuje się sączki np. w roztworze fizjologicznym jako rozcieńczeniu wyjściowym do dalszych. Byłoby to zresztą zbędna komplikacja bowiem, jak stwierdzono w setkach badań porównawczych, praktycznie wystarcza jedno rozcieńczenie (rzędu 1:100). Najgęstsze nawet posiewy można liczyć przy zastosowaniu mikroskopu, uzyskując wyniki równorzędne z płytkami zawierającymi 30—300 kolonii.

Liczenie i interpretacja.

24 lub 48 godzinne hodowle płytkowe liczy się w zależności od gęstości wysiewu gołym okiem, przy pomocy lupy lub mikroskopu. Przy liczeniu mikroskopowym korzystne jest stosowanie perforowanego szablonu (pokazanego na fot. 4), który przykłada się na płytkę by zapewnić losowość 20 pól widzenia i ich reprezentatywność względem powierzchni płytki. Przy bardzo gęstych posiewach wygodne jest stosowanie zmniejszającej wkładki okularowej ograniczającej pole widzenia.

Stosując stale te same warunki oraz kombinacje okularów i obiektywów, można dla ułatwienia wyliczyć mnożniki lub tabelki do przeliczania wyników na ilość bakterii w gramie badanego produktu.

Liczenie gęsto wysianych płytek jest chyba najbardziej kontrowersyjnym elementem metody. Tradycyjne zastrzeżenia dotyczą tu:

a) technicznych trudności liczenia gęstych wysiewów,

b) rosnącego z gęstością wysiewu prawdopodobieństwa powstawania kolonii z dwu lub więcej komórek,

c) spotykanego zjawiska antagonistycznego oddziaływania niektórych szczepów.

Nie kwestionując teoretycznej zasadności tych zastrzeżeń można im jednak przeciwstawić następujące kontrargumenty:

ad a) Stosując powiększenie mikroskopowe  $8 \times 15$  i zmniejszającą wkładkę okularową liczyliśmy z łatwością płytki o gęstości wysiewu do 100000 kolonii/cm<sup>2</sup> agaru. Ponadto sondując mikroskopem warstwę agaru można liczyć kolonie wgłębne nawet na płytkach ze wzrostem powierzchniowo rozlanym.

ad b) Wylane na płytkę podłoże ma ograniczoną (stałą) pojemność metaboliczną, w związku z czym wraz z rosnącą gęstością wysiewu (D) maleje średnia objętość kolonii (V) w takim stopniu, że:

$$D \cdot V \cong \text{constans}$$

Powoduje to, że w miarę malejących odległości kolonie wgłębne (a tych jest znakomita większość) karłowacieją bez tendencji do zlewania się. Nawet stykające się ze sobą kolonie wgłębne zachowują wyraźną odrębność budowy przestrzennej.

ad c) Jeśli nawet w badanym produkcie trafiają się odmiany antagonistyczne, to ich wzajemne oddziaływanie hamujące musi się w tych warunkach uwidocznić znacznie wyraźniej niż w posiewie, w którym (wskutek rozcieńczenia w stałym podłożu) rosną między nimi odległości, a maleje dyfuzja i stężenie substancji hamujących. Tak więc w warunkach nawet gęstego posiewu mają one potencjalnie większe szanse rozwoju w mikrokolonie, niż w naturalnych warunkach ekologicznych badanego produktu.

Szczegółowe rozwijanie i eksperymentalne poparcie tych tez wykracza poza ramy niniejszego artykułu.

Wieloletnie doświadczenia i liczne badania porównawcze potwierdziły walory opisywanej metody, która dokładnością i precyzją nie ustępuje metodom ilościowym uznanym za klasyczne i wzorcowe.

Wyniki tych badań przedstawione zostaną w następnej publikacji.

Adres autora: dr Celestyn Szczucki, Łódź, ul. Inżynierska 1/3.

Щуцки Ц. — Новый „бумажный” метод микробиологических количественных исследований мяса и мясных продуктов.

Разработан и проверен в практике собственный скорый метод микробиологических исследований. Метод состоит в количественном изъятии образцов мясного сока при помощи стандартных бумажных фильтров, и в гомогенизации их прямо в разжиженной агаровой среде при помощи вращающегося магнитного поля. Описан способ приготовления фильтров, осуществления посевов и подсчета колоний на густо засеянных чашках.

Szczucki C. — The new paper method of microbiological quantitative investigations of meat and meat products.

The author describes the quick routine method worked out by himself and tested in practice. It lies in quantitative collecting of meat juice with the help of standard filter papers and their homogenization just on a liquidized agar medium with the use of rotating magnetic field.

The way of preparing filters, making inoculations and counting richly inoculated dishes is also described.

Szczucki C. — Neue Fließpapier mikrobiologische Methode zu quantitativen Untersuchungen von Fleisch und Fleischprodukte.

Verfasser beschreibt eine von selbst ausgearbeitete und praktisch geprüfte rasche rutinierte Methode. Dieselbe besteht in quantitativer Entnahme vom Fleischsaft mittels standardisierter Fließpapierdränröhrchen und derer unmittelbarer Homogenisierung auf flüssiger Agarunterlage mit Hilfe eines rotierenden magnetischen Feldes. Es wird die Art der Vorbereitung von Dränröhrchen, Ausführung der Aussaat und Zählung der dicht ausgesäten Schalen angegeben.

## CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

TADEUSZ JASTRZĘBSKI, ZYGMUNT CYGAN, JULIAN NOWAK

### Badania nad metodami wyosabniania *Clostridium*.

#### I. Ocena przydatności inhibitorów w podłożach wybiórczych

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weterynarii WSR  
w Lublinie

Kierownik: prof. dr T. JASTRZĘBSKI

Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej  
w Lublinie

Kierownik: dr T. DĄBROWSKI

Beztlenowe warunki hodowli nie eliminują dostatecznie rozwoju towarzyszącej beztlenowcom flory tlenowcowej. W związku z tym, zastosowanie podłoży wybiórczych często jest warunkiem wyosabniania *Clostridi*. Dotychczas stosowano takie inhibitory jak azydek sodu, fiolet krystaliczny, kwas sorbinowy oraz antybiotyki. Azydek sodu działający jako inhibitor oksydazy cytochromowej, zastosowany został do podłoży wybiórczych dla beztlenowców przez Johanssona (10), potem Prévot i Thouvenot (18), Forget i Fredette (6) oraz Szynekiewicz (23) w dawkach 100—500

mcg/ml w stałych oraz 2000 mcg/ml w podłożach płynnych. Jednak badania przeprowadzone przez Mossela i wsp. (15) oraz Gibbs i Freame (8) ustaliły zbyt małą selektywność azydku sodu.

Fiolet krystaliczny (1,3—5 mcg/ml podłoża stałego) zaproponowany m.in. przez Maki i Pickarda (14), Blendena i Merilana (2), Szynekiewicz (22, 23) w doświadczeniach Gibbsa i Freame (7) okazał się mało przydatny. Mało aktywny jest wg Mossela i wsp. (15) oraz Gibbsa i Freame (8) również kwas sorbinowy, (stosowany przez Emarda i Vaughna (5),