

TADEUSZ JASTRZĘBSKI, ZYGMUNT CYGAN

Badania nad metodami wyosabniania *Clostridium* II. Porównanie przydatności podłoży wybiórczych i metod termicznych

Katedra Mikrobiologii Wydziału Weternarii WSR
w Lublinie

Kierownik: prof. dr T. JASTRZĘBSKI

Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej w Lublinie
Kierownik: dr T. DĄBROWSKI

Opracowanie możliwie prostej i skutecznej metody wyosabniania *Clostridium* z materiału obficie zanieczyszczonego florą tlenowcową ma ogromne znaczenie praktyczne.

Poszczególni autorzy zalecają użycie podłoży z inhibitorami (1, 3, 6, 7, 8, 9, 15), metody rozcieńczeń w wysokim agarze (16, 20), eliminacji cieplnej bakterii nie zarodnikujących (17, 22, 28), a dla *Cl. perfringens* — hodowli w 46—47° z krótkim okresem namnażania w podłożu płynnym (23), dla *Cl. oedematiens* — długotrwałą inkubacją wstępną (13, 18).

Spośród podłoży z inhibitorami, najlepsze wyniki dały podłoża z antybiotykami, a zwłaszcza neomycyną. Wskaźnik wykrywalności *Clostridium* z treści jelit przy namnożeniu wstępnym na podłożu Wrzodka i przesiewie na podłożu stałe z neomycyną wyniósł w badaniach Lilly (15) — 79,4%, Horodniceanu i Sasarmana (12) — 94% i Cygana (7) do 100%, a z ziemi wg Willisa i Hobbs (27) oraz Jastrzębskiego i wsp. (13) do około 100%. Użycie w tych warunkach neomycyny również do podłoża namnażającego wstępnego — nie zwiększało wykrywalności *Clostridium* (15). Aktywność selektywna innych inhibitorów (streptomycyna, polimyksyna B, sulfamidy, azydek sodu, fiolet kryst.) oddzielnie lub w mieszance (1, 24, 25), ewentualnie w połączeniu z metodą szybkich pasażów w podłożu płynnym, lub rozcieńczeniami w agarze półpłynnym (21) względnie z podgrzewaniem (15) — znalazły ograniczone zastosowanie.

Metoda rozcieńczeń w głębokim agarze, umożliwiająca wygodną ocenę morfologii kolonii, jest w warunkach normalnego laboratorium zbyt kłopotliwa gdyż wymaga dla uzyskania dobrego rozcieńczenia użycia kilkunastu nieraz rurek Garretta i Pricketta z podłożem, a dla wyosobnienia kolonii — przecinania próbek. Nada się ona raczej dla laboratoriów Higieny Środków Spożywczych badających *Clostridia* ilościowo w podłożu Wilson-Blaira.

Powszechnie stosowana selekcja termiczna przeważnie (70—90°C przez 10—20 min.) zapewnia dużą skuteczność w usuwaniu tlenowców ale niszczy również szczepy trudno zarodnikujących laseczek *Clostridium*. Ponadto metoda ta powoduje zniszczenie znacznej części szczepów silnie toksynotwórczych (18, 22, 28).

Dużą przydatność dla wyosabniania *Cl. perfringens* wydaje się posiadać metoda Sasarmana i Horodniceanu (23). Wykorzystuje ona właściwości *Cl. perfringens* szybkiego rozmnażania się (5 godzin) i dawania wzrostu w 46—47°C. Wskaźnik izolacji *Cl. perfringens* z kału wynosił przy przesiewie na pożywkę Zeisslera bez inhibitorów — 78%, a z dodatkiem siarczanu neomycyny (250 mcg/ml) — 98%. Ponadto zaletą metody jest skrócenie czasu izolacji *Cl. perfringens* z 36—48 do 24 godz. Maksymalną wykrywalność *Cl. oedematiens* w glebie, bez eliminowania szczepów ciepłowrażliwych zapewnia metoda 3 tygodniowej inkubacji wstępnej na podłożu płynnym z przesiewem na podłożu Naglera z krwią lub dodatkową selekcją termiczną (18) albo z wysiewem na podłożu Zeisslera z siarczanem neomycyny (13). W stosunku do innych, łatwo zarodnikujących *Clostridi*, metoda powyższa nie była jednak używana.

Zadaniem badań własnych było opracowanie możliwie prostego i skutecznego schematu wyosabniania *Clostridium* z hodowli zakaźnych mieszaną florą tlenowcową.

Materiał i metody

Inhibitory. Do badań użyto: azydek sodu (Zakłady Elektrochemiczne Zabkowice); fiolet krystaliczny („Bayer”); siarczan neomycyny i zasadę streptomycyny („POLFA”) oraz siarczan polimyksyny B („Friszer”).

Podłoża wybiórcze. Odpowiednie roztwory inhibitorów przygotowywano w bulionie odżywczym o pH=7,6 z dodatkiem 1% glikozy, po czym dodawano je do wyjałowionych podłoży Zeisslera (3% agar odżywczy, 1% glikozy, 15% odwłóknionej krwi owczej) i Wrzodka — Tarozzi (z 1% glikozy).

Szczepy. — Użyte beztlenowce: *Cl. perfringens* A 497 i 267; B 270; C 234 i 367; D 210 i 368; E 236; *Cl. oedematiens* A 292, 426, 483, 630 i 650; *Cl. septicum* 205, 631 i 632; *Cl. botulinum* A 1161; B 194 i 386; C Nerz; E 1105; *Cl. sordelli* 271, 536 i 567; *Cl. bifermentans* 149 i 420; *Cl. histolyticum* 119; *Cl. tetani* CN 655; *Cl. fesceri* 913 i *Cl. sporogenes* 477 (otrzymane z PZH w Warszawie lub wyosobnione w Katedrze Mikrobiologii Wet. WSR w Lublinie).

Użyte tlenowce: *E. coli* O8, O71, O139, i 431; *Proteus* OX 19, L1, *S. enteritidis* Gärtner i *S. gallinarum*, *Corynebact. equi*, *Aerobacter aerogens*, *B. megatherium*, *B. mycoides*, *B. circulans*, *B. subtilis* 833, 879 i 880, *B. cereus* 879, *Str. faecalis*, *Str. pyogenes* i *Streptoc. sp* (2), *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* 209-P, *epidermidis*, *Pseudomonas pyocyaneum* i *Listeria monocytogenes*.

Materiałem do badań były mieszaniki bakteryjne (Mb) zawierające 1/4 hodowli bulionowej poszczególnych szczepów *Clostridium* (inkubowanych 24 godz. w 37°C, po czym 4 dni dla zarodnikowania w temp. pokojowej) oraz 3/4 mieszaniki hodowli bulionowych wszystkich 28 szczepów tlenowców inkubowanych 24 godz. w 37°C.

Warunki beztlenowe uzyskiwano metodą pyrogallową (13). Za dowód przydatności selektywnej metody i podłoży wybiórczych uznawano możliwość uzyskania czystej hodowli laseczek wszystkich badanych szczepów *Clostridium*.

Selekcja termiczna. Badane Mb ogrzewano w temperaturze 85°C przez 15 min., wysiewano na podłoże Zeisslera oraz na stałe i płynne podłoża z inhibitorami.

Inkubacja w 46–47°C. Badane Mb (8 szczepów *Cl. perfringens* A-E) wysiewano na podłoże Wrzóska-Tarozzi, inkubowano w 46–47°C w ciągu 5 godzin, po czym wysiewano na podłoża Zeisslera (zwykle i zawierające 125 mcg/ml neomycyny).

Metoda przedłużonej inkubacji w 37°C. Badane Mb wysiewano na pożywkę Wrzóska, inkubowano w 37°C przez okres 7–10 dni, po czym przesiewano na podłoże Zeisslera z 125 mcg/ml neomycyny.

Wyniki i omówienie

Podłoża stałe. Wyniki badań podają tabele 1 i 2. Wynika z nich, że wszystkie użyte podłoża wybiórcze hamowały rozwój całej badanej flory tlenowej prócz ziarniaków. Poprawy selektywności podłoży nie zwiększyło wprowadzenie streptomycyny nawet w dawkach 5-krotnie wyższych od dopuszczalnych dla *Clostridium*, spowodowało ono natomiast zmniejszenie wykrywalności laseczek *Clostridium*. Najwyższy wskaźnik izolacji *Clostri-*

Tab. 1. Wyosabnianie poszczególnych szczepów *Clostridium* sp. na podłożach wybiórczych stałych

Mieszanka 27 hodowli tlenowców z <i>Clostridium</i> sp.	Neomycyna 125 mcg/ml			Neomycyna 125 mcg/ml Streptomycyna 50 mcg/ml			Neomycyna 125 mcg/ml Streptomycyna 50 mcg/ml Fiolet kryst. 2 mcg/ml			Neomycyna 125 mcg/ml Azydek sodu 200 mcg/ml Fiolet kryst. 2 mcg/ml			Neomycyna 50 mcg/ml Streptomycyna 50 mcg/ml		
	Wynosobniono <i>Clostridium</i>			Wynosobniono <i>Clostridium</i>			Wynosobniono <i>Clostridium</i>			Wynosobniono <i>Clostridium</i>			Wynosobniono <i>Clostridium</i>		
	ogółem	%	wzrost tlenowców	ogółem	%	wzrost tlenowców	ogółem	%	wzrost tlenowców	ogółem	%	wzrost tlenowców	ogółem	%	wzrost tlenowców
<i>Cl. perfringens</i> A-E (8)	8/8		Z	8/8		Z	8/8		Z	8/8		Z	8/8		Z
<i>Cl. oedematiens</i> A (5)	4/5		Z	4/5		Z	3/5		Z	3/5		Z	3/4		Z
<i>Cl. septicum</i> (3)	3/3		Z	3/3		Z	2/3		Z	3/3		Z	3/3		Z
<i>Cl. sordelli</i> (3)	3/3		Z	3/3		Z	3/3		Z	2/3		Z	3/3		Z
<i>Cl. botulinum</i> A-B (3)	3/3		Z	3/3		Z	3/3		Z	3/3		Z	3/3		Z
<i>Cl. fesceri</i> (1)	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z
<i>Cl. tetani</i> (1)	0		Z	0/1		Z	0/1		Z	0/1		Z	1/1		Z
<i>Cl. histolyticum</i> (1)	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z
<i>Cl. bifermentans</i> (2)	2/2		Z	2/2		Z	2/2		Z	2/2		Z	2/2		Z
<i>Cl. sporogenes</i> (1)	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z
Razem	26/27	96,3		26/28	92,8		24/28	85,7		24/28	85,7		26/27	96,3	

Tab. 2. Wyosabnianie poszczególnych szczepów *Clostridium* sp. na podłożach wybiórczych stałych

Mieszanka 27 hodowli tlenowców z <i>Clostridium</i> sp (5:1)	Streptomycyna 250 mcg/ml Polimyksyna 100 mcg/ml			Streptomycyna 250 mcg/ml Polimyksyna 12 mcg/ml Fiolet kryst. 2 mcg/ml			Streptomycyna 250 mcg/ml Polimyksyna 12 mcg/ml Azydek sodu 200 mcg/ml			Streptomycyna 50 mcg/ml Polimyksyna 100 mcg/ml			Streptomycyna 50 mcg/ml Polimyksyna 12 mcg/ml Fiolet kryst. 2 mcg/ml			Streptomycyna 50 mcg/ml Polimyksyna 12 mcg/ml Azydek sodu 200 mcg/ml		
	Wynosobniono <i>Clostridium</i>			Wynosobniono <i>Clostridium</i>			Wynosobniono <i>Clostridium</i>			Wynosobniono <i>Clostridium</i>			Wynosobniono <i>Clostridium</i>			Wynosobniono <i>Clostridium</i>		
	ogółem	%	wzrost tlenowców	ogółem	%	wzrost tlenowców	ogółem	%	wzrost tlenowców	ogółem	%	wzrost tlenowców	ogółem	%	wzrost tlenowców	ogółem	%	wzrost tlenowców
<i>Cl. perfringens</i> A-E (8)	8/8		Z	8/8		Z	8/8		Z	8/8		Z	8/8		Z	8/8		Z
<i>Cl. oedematiens</i> A (5)	0/5		Z	1/4		Z	1/5		Z	3/5		Z	4/5		Z	0/5		Z
<i>Cl. septicum</i> (3)	0/3		Z	0/3		Z	0/3		Z	1/3		Z	3/3		Z	0/3		Z
<i>Cl. sordelli</i> (3)	0/3		Z	0/3		Z	0/3		Z	1/3		Z	2/3		Z	0/2		Z
<i>Cl. botulinum</i> A,B (3)	1/3		Z	1/3		Z	1/3		Z	2/3		Z	3/3		Z	2/2		Z
<i>Cl. fesceri</i> (1)	0/1		Z	0/1		Z	0		Z	0		Z	1/1		Z	0		Z
<i>Cl. tetani</i> (1)	0/1		Z	0		Z	0		Z	0		Z	0		Z	0		Z
<i>Cl. histolyticum</i> (1)	0		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z	0		Z
<i>Cl. bifermentans</i> (2)	2/2		Z	1/1		Z	2/1		Z	2/2		Z	2/2		Z	2/2		Z
<i>Cl. sporogenes</i> (1)	0		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z	1/1		Z
Razem	11/26	42,3		13/25	52		14/25	56		19/26	73		25/27	92,6		13/23	50	

dium uzyskano przy wysiewie na podłoże z samą neomycyną w ilości 125 mcg/ml, lub neomycyną i streptomycyną — po 50 mcg/ml tj. 96,3%. Nieco słabszy pozytywny wynik (92,8%) dało podłoże z 125 mcg/ml neomycyny i 50 mcg/ml streptomycyny oraz podłoże z 50 mcg/ml streptomycyny, 12 mcg/ml polimyksyny i 2 mcg/ml fioletu krystalicznego (92,6%). Wskaźnik ten odpowiada lub nawet nieco przekracza dane Lilly (15) oraz Horodniceanu i Sasarmana (12). Autorzy ci uzyskali wykrywalność od ok. 79% do 94% przy posiewie hodowli uprzednio namnożonej w podłożu płynnym na podłoża stałe z neomycyną (50—250 mcg/ml) jednak operowali tylko *Cl. perfringens*. Próby zahamowania wzrostu ziarniaków przez włączenie do podłoża obok antybiotyków fioletu krystalicznego i azydku sodu nie dały pozytywnych wyników, natomiast pogorszyły w pewnym stopniu wykrywalność *Clostridium*. Na uwagę zasługuje mała wrażliwość wszystkich zbadanych szczepów *Cl. perfringens* natomiast duża *Cl. oedematiens*. Żadne z uzyskanych selektywnych podłoży nie zapewniło wyosobnienia wszystkich użytych szczepów *Cl. oedematiens* prawdopodobnie na skutek powolnego wzrostu tego zarazka.

Podłoża płynne. Wyniki badań podano w tabeli 3. Wynika z niej, że żaden z inhibitorów, zarówno pojedynczo jak również w połączeniach nie zahamował wzrostu wszystkich użytych tlenowców. Również neomycyna, która jak wykazano poprzednio, hamuje skutecznie czyste szczepy *Enterobacteriaceae*, przy użyciu jako składnika mieszanki tlenowej zawiodła, nawet przy zwiększeniu koncentracji do 2000 mcg/ml. Być może związane to jest z zwiększoną koncentracją substancji białkowych w badanym materiale, bądź też jeśli

chodzi o streptomycynę ze spadkiem aktywności tego antybiotyku w środowisku beztlenowym w obecności glikozy i fosforanów (2, 10).

Spośród przebadanych selektywnych podłoży płynnych stosunkowo najlepsze wyniki dało podłoże Wrzoska-Tarozzi z dodatkiem 500—2000 mcg/ml neomycyny ale jedynie w stosunku do szczepów *Cl. perfringens* A-E, *Cl. bifermentans* i *Cl. histolyticum*. Wykrywalność innych *Clostridium* spadała b. znacznie, niekiedy do zera. Użycie samej streptomycyny (250—1000 mcg/ml) dało wyniki zupełnie niewystarczające (brak zahamowania wzrostu ziarniaków, pałeczek i laseczek). Wynik ten pokrywa się z obserwacjami Willisa (26) oraz Jastrzębskiego i wsp. (13). Również ograniczoną przydatność wykazały podłoża z fioletem krystalicznym (25 mcg/ml) i azydkiem sodu (250—1000 mcg/ml). Użycie łączne neomycyny, streptomycyny, fioletu krystalicznego i azydku sodu w maksymalnych dopuszczalnych dla laseczek beztlenowych aczkolwiek ograniczyło zanieczyszczenia bakteryjne do samych ziarniaków, to równocześnie zahamowało wzrost wielu gatunków *Clostridium*.

Z przeprowadzonych badań wynika, że wartość selektywnych podłoży płynnych jest niewielka, potwierdzając obserwacje Lilly'ego (15) zalecającego namnażanie wstępne w podłożach bez inhibitorów.

Metody termiczne

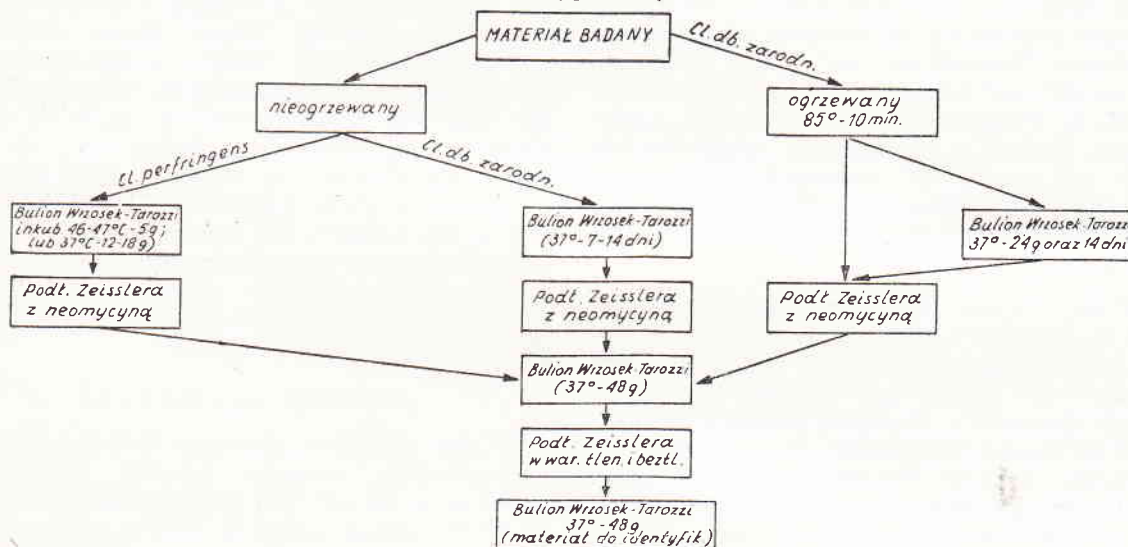
Wyniki przeprowadzonych doświadczeń nad przydatnością metody selekcji termicznej, wzrostu w 46—47°C i przedłużonej inkubacji w 37°C podaje tabela 4. Jak z niej wynika, metoda podgrzewania mieszaniny bakteryjnej do 85°C przez 10 min. usuwa wzrost wszystkich użytych tlenowców za wyjątkiem lase-

Tab. 3. Wyosabnianie poszczególnych szczepów *Clostridium* sp. przy użyciu podłoży wybiórczych płynnych

Mieszanina 27 hodowli tlenowców z <i>Clostridium</i> sp.	Neomycyna 500-1000-2000 μg/ml		Streptomycyna 250-500-1000 μg/ml		Fiolet kryst. 25 μg/ml		Azydek sodu 250-500-1000 μg/ml		Neomycyna 500 μg/ml Streptomycyna 250-500 μg/ml Fiolet kryst. 25 μg/ml Azydek sodu 50-200 μg/ml		Neomycyna 200 μg/ml Streptomycyna 50 μg/ml Fiolet kryst. 10 μg/ml Azydek sodu 25 μg/ml	
	Wyosabniono <i>Clostridium</i>		Wyosabniono <i>Clostridium</i>		Wyosabniono <i>Clostridium</i>		Wyosabniono <i>Clostridium</i>		Wyosabniono <i>Clostridium</i>		Wyosabniono <i>Clostridium</i>	
	ogółem		ogółem		ogółem		ogółem		ogółem		ogółem	
		%		%		%		%		%		%
<i>Cl. perfringens</i> A-E (8)	8/8		ZP 7/8		ZPL 6/8		ZP 6/8		ZP 6/8		Z 8/8	
<i>Cl. oedematiens</i> A (5)	0/5		ZP 0/5		ZPL 0/5		ZP 0/5		ZP 0/5		Z 0/5	
<i>Cl. septicum</i> (3)	0/3		ZP 0/3		ZPL 0/3		ZP 0/3		ZP 0/3		- 0/3	
<i>Cl. sordelli</i> (3)	0/3		ZP 0/3		ZPL 0/3		ZP 0/3		ZP 0/3		- 0/3	
<i>Cl. botulinum</i> A,B,C,E (5)	0/5		ZP 0/5		ZPL 0/5		ZP 1/5		ZP 1/5		Z 1/5	
<i>Cl. fesceri</i> (1)	0/1		ZP 0/1		ZPL 0/1		ZP 0/1		ZP 0/1		- 0/1	
<i>Cl. tetani</i> (1)	0/1		ZP 0/1		ZPL 0/1		ZP 0/1		ZP 0/1		- 0/1	
<i>Cl. histolyticum</i> (1)	1/1		ZP 1/1		ZPL 0/1		ZP 1/1		ZP 1/1		Z 0/1	
<i>Cl. bifermentans</i> (2)	2/2		ZP 1/2		ZPL 0/2		ZP 2/2		ZP 2/2		Z 0	
<i>Cl. sporogenes</i> (1)	1/1		ZP 0/1		ZPL 1/1		ZP 1/1		ZP 1/1		Z 0/1	
Razem	12/30	40	9/30	30	8/30	26,6	7/29	24,1	11/30	36,6	9/28	32,1

Tab. 4. Wyosabnianie poszczególnych szczepów *Clostridium* sp. przy użyciu różnych metod

Mieszanka 27 hodowli tlenowców z <i>Clostridium</i> sp.	Metoda termiczna bez namnażania		Metoda termiczna z namnażaniem		Metoda hodowli w 46-47°C		Metoda hodowli przedłużonej w 37°C	
	Wysobnienie <i>Clostridium</i>		Wysobnienie <i>Clostridium</i>		Wysobnienie <i>Clostridium</i>		Wysobnienie <i>Clostridium</i>	
	ogółem	%	ogółem	%	ogółem	%	ogółem	%
<i>Cl. perfringens</i> A-E (8)	0		0		3/8	37,5	0	
<i>Cl. oedematiens</i> A (5)	3/5	60	3/5	60	0		5/5	100
<i>Cl. septicum</i> (3)	3/3	100	2/3	66,7	0		1/3	33,3
<i>Cl. sordellii</i> (3)	0/3	0	3/3	100	0		0/2	0
<i>Cl. botulinum</i> A,B,C,E (5)	3/5	60	2/5	40	0		2/3	66,7
<i>Cl. fescii</i> (1)	1/1	100	1/1	100	0		0	0
<i>Cl. tetani</i> (1)	0		0		0		0	0
<i>Cl. histolyticum</i> (1)	1/1	100	1/1	100	0		1/1	100
<i>Cl. bifermentans</i> (2)	2/2	100	1/2	50	0		1/1	100
<i>Cl. sporogenes</i> (1)	1/1	100	1/1	100	0		1/1	100
Razem	14/21	66,7	14/21	66,7	3/8	37,5	11/16	68,8

Tab. 5. Proponowany schemat izolowania chorobotwórczych gatunków *Clostridium* (wg Jastrzębskiego i Cygana)

czek rzekomowaglikowych. Metoda przy zastosowaniu wysiewu bezpośredniego i po namnożeniu, pozwoliła na wyosabnienie 80% spośród zbadanych szczepów *Clostridium*. Badaniem nie objęto *Cl. perfringens* ze względu na trudne zarodnikowanie tego zarazka.

Co do metody hodowli w 46-47°C to dodatni wynik izolacji *Cl. perfringens* uzyskano u 3 na 8 zbadanych szczepów. Okazała się ona mało efektywna w usuwaniu wzrostu ziarniaków, pałeczek oraz laseczek. Metoda ta może być w pełni przydatna przy równoczesnym zastosowaniu podłoża wybiórczych. Potwierdzono, że zaletą jej jest głównie skrócenie czasu izolacji *Cl. perfringens* z ok. 36 do 24 godzin (23).

Badania nad metodą przedłużonej inkubacji w 37°C wskazują, że może być ona przydatna nie tylko dla wyosabniania szczepów *Cl. oedematiens*, o czym uprzednio donieśli Nishida i Nakagawara (18) oraz Jastrzębski i wsp. (13), lecz także innych łatwo zarodnikujących szczepów *Clostridium* np. *Cl. botulinum*, *Cl. sporogenes* itp. Niezarodnikujące tle-

nowe i beztlenowe drobnoustroje ulegają w warunkach tej metody procesowi postępującej cytolizy, co ułatwia izolację *Clostridii* z form zarodnikowych. Wartość selektywną tej metody podnosi wysiew na podłoża wybiórcze.

Wnioski

Najszerze widmo wykrywalności *Clostridium* zapewnia wysiew bezpośredni z materiału na stałe selektywne podłoża. Włączenie do metodyki hodowli wstępnej na podłożu płynnym, zwiększa ilość komórek niektórych gatunków rodzaju *Clostridium*, powodując jednak jednocześnie zanik niektórych innych gatunków beztlenowców. Spośród wypróbowa-

nych na podłożu Zeisslera inhibitorów flory tlenowcowej wybrano trzy, które zapewniają zahamowanie wszystkich użytych szczepów, za wyjątkiem ziarniaków. Uzyskać pełnego zahamowania wzrostu ziarniaków nie udało się. Najlepsze wyniki — ponad 90% wykrywalności użytych beztlenowców, dały następujące inhibitory:

- 1 — neomycyna 125 mcg/ml (96,3%)
- 2 — neomycyna 50 mcg/ml + streptomycyna 50 mcg/ml (96,3%)
- 3 — streptomycyna 50 mcg/ml + polimyksyna B 12 mcg/ml + fiolekt krystaliczny 2 mcg/ml (92,6%).

Przydatność selektywnego podłoża płynnego Wrzosa-Tarozzi z wypróbowanymi inhibitorami jest bardzo ograniczona. Pozytywne wyniki osiągnięto tylko w odniesieniu do *Cl. perfringens* (8 szczepów), *Cl. bifermentans* (2 szczepy) i *Cl. histolyticum* (1 szczep), przy użyciu neomycyny (500 mcg/ml).

Metoda hodowli wstępnej w 46-47°C (12) może być z korzyścią użyta dla izolacji *Cl. perfringens*.

Metoda selekcji termicznej (85°C — 10 min.) oraz metoda przedłużonej inkubacji (7—10 dni) dają pozytywne wyniki u wszystkich *Clostridium* łatwo zarodnikujących (a więc nie u *Cl. perfringens*).

Na podstawie przeprowadzonych badań zaproponowano schemat postępowania diagnostycznego.

Piśmiennictwo

1. Angelotti R., Hall H. E., Foter M. J., Lewis K. H.: Appl. Microbiol. 10, 193, 1962.
2. Bendi i wsp.: Science 1946 — cyt. wg poz. 26.
3. Blendon D. C., Merilan Ch. P.: Am. J. Ves. Res. 22, 944—947, 1961.
4. Cobb L. M., McKay A., Archibald J.: Archives Surg. 78, 546, 1959.
5. Cobb L. M., McKay A.: J. Comp. Path. Therapeut. 72, 92—96, 1962.
6. Cygan Z.: Materiały Sesji Beztlencowcowej. Lublin 1967 — w druku.
7. Cygan Z.: Praca doktorska. Lublin 1967.
8. Emard L. O., Vaughn R. H.: J. Bact. 63, 487, 1952.
9. Forget A., Fredette V.: J. Bact. 83, 1217, 1962.
10. Geiger i wsp.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1946 — cyt. wg poz. 26.
11. Hayward N. J.: Bull. Off. Int. Epiz. 59, 1401, 1963.
12. Horodniceanu T., Sasarman A.: Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol. 9, 633, 1964.
13. Jastrzębski T., Cygan Z., Nowak J.: Medycyna Wet. 24, 586, 1968.
14. Johansson K. R.: J. Bact. 65, 225, 1953.
15. Lillu H. A.: J. Med. Lab. Techn.
16. McClung L. S., Lindberg R. B.: Manual of Microbiol. Meth., McGraw-Hill Book Company, New York—Toronto—London 1957.
17. Meisel H., Trembowlar P., Pogorzelska B.: Med. Dośw. i Mikrobiol. 4, 359, 1960.
18. Nishida S., Nakagawara G.: J. Bact. 88, 1636, 1964.
19. Nishida S., Imatsumi M.: J. Bact. 91, 477, 1966.
20. Pohl P., Thomas J.: Ann. Med. Vet. 110, 422, 1966.
21. Prévot A. R., Thouvenot H.: Ann. Inst. Pasteur 83, 236, 1954.
22. Sanada I., Nishida S.: J. Bact. 89, 626, 1965.
23. Sasarman A., Horodniceanu T.: Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol. 20, 471, 1961.
24. Szynkiewicz Z.: Biuletyn III Zjazdu PTNW. Lublin 1968.
25. Wetzler T. F., Marshall J. D., Cardella M. A.: Amer. J. Clin. Path. 26, 418, 1956.
26. Willis A. T.: J. Path. Bact. 74, 113, 1957.
27. Willis A. T., Hobbs G.: J. Path. Bact. 77, 511, 1959.
28. Yamagishi T., Ishida S., Nishida S.: J. Bact., 88, 646, 1964.

Adres autora: prof. dr Tadeusz Jastrzębski, Lublin, ul. Akademicka 11.

Ятшмемски Т., Цыган З. — Исследования по методике выделения палочек *Clostridium*. II. Сравнительные исследования эффективности избирательных сред и термических методов.

Исследовали селективную эффективность: 1) сред Zeisslera, Wrzosek-Tarozzi с ингибиторами — неоми-

цином, стрептомицином, полимиксином В, азидом натрия и кристалл-виолетом, 2) инкубации в 46—47°C, 3) термической селекции в 85°C (10 мин.), 4) продолженной инкубации в 37°C — по отношению к смеси 27 штаммов аэробов и к отдельным штаммам рода *Clostridium* (28 штаммов из 10 видов). Самые лучшие результаты выявлены исследованных штаммов *Clostridium* выше чем 90% получили применяя в плотной среде Zeissler следующие ингибиторы: 1) неомицин 125 µg/ml — 96,3%, 2) неомицин 125 µg/ml + стрептомицин 50 µg/ml — 96,3%, 3) стрептомицин 50 µg/ml + полимиксин В 12 µg/ml + кристалл-виолет 2 µg/ml — 92,6%. Эффективность в. н. ингибиторов в жидкой среде Wrzosek-Tarozzi небольшая — ингибиторы тормозящие рост аэробов препятствовали в значительной степени также рост у анаэробов. Метод предварительной инкубации в 46—47°C может быть выгодно применен при поисках за *Cl. perfringens*. Метод термической селекции и продолженной инкубации дают положительные результаты только у *Clostridium* дающих легко споры. Разработана схема изоляции штаммов *Clostridium* из сильно загрязненных материалов.

Jastrzębski T., Cygan Z. — The investigations on *Clostridium* isolation methods. II. The comparison of usefulness of selective media and thermic methods.

The selective usefulness was evaluated of Zeissler's and Wrzosek-Tarozzi's media with inhibitors (neomycine, streptomycin, B polymyxin, sodium azide, and cristal violet) and the methods of culture in 46—47°C preheating (85°C—10 min) and prolonged incubation in 37°C in relation to the mixture of 27 cultures of aerobic bacteria and each particular *Clostridium* sp. strain (28 strains from 10 species). The best results above 90 per cent of detecting of *Clostridium* strains used were obtained with the following inhibitors: 1) neomycine 125 µg/ml (96.3 per cent), 2) neomycine 125 µg/ml + streptomycin 50 µg/ml (96.3 per cent), 3) streptomycin 50 µg/ml + B polymyxin 12 µg/ml cristal violet 2 µg/ml (92.6 per cent). The usefulness of Wrzosek-Tarozzi's medium with the tested inhibitors is slight. The inhibitors stopping the aerobic bacteria stopped in an evident degree also anaerobic bacteria. The method of primary culture in 46—47°C may be successfully used in search of *Clostridium* perfringens. The methods of thermic selection and prolonged incubation give positive results in easily germinating *Clostridia*. The scheme was worked out of *Clostridium* isolation from heavily contaminated material.

MARIAN ŚWIETLIKOWSKI, DANUTA ŻEBROWSKA-PLATA,
ANDRZEJ MALCZEWSKI

O potrzebie leczenia amidostomatozy u gęsi rzeźnych*)

Zakład Parazytologii Polskiej Akademii Nauk
Kierownik: prof. dr W. MICHAJŁOW

Kierownik Wojewódzkiej Inspekcji Sanitarnej w Zakładach Jajczarsko-Drobiarskich w Kutnie dr Z. Makowski zauważył, że od kilku lat, główną przyczyną upadków gęsi w okresie tuczu są pasożyty. W wyniku tej obserwacji Dyrekcja Zakładów Jajczarsko-Drobiarskich zwróciła się do Zakładu Parazytologii PAN o pełne rozpoznanie przyczyny i znalezienie środków zaradczych.

*) Praca została wykonana na zlecenie Zakładu Jajczarsko-Drobiarskiego w Kutnie.

Wstępne badania rozpoczęte w listopadzie 1966 r. wykazały wysoką ekstensywność i intensywność zarażenia gęsi *Amidostomum anseris*. Metodą koproskopii stwierdzono ekstensywność inwazji sięgającą 45% stanu stada gęsi, natomiast sekcyjnie 100%, przy nienotowanej dotychczas w literaturze intensywności inwazji sięgającej 3000 nicieni w żołądku.

W 1967 r. ekstensywność inwazji badana metodą koproskopii jeszcze wzrosła i wynosiła 68—100% w zależności od terenu, z którego