



УДК 619:579

Т.О. ГАРКАВЕНКО, канд. вет. наук, с. н. с.

Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Київ

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ХРОМОГЕННИХ СЕРЕДОВИЩ ОДНОЕТАПНОГО ВИДІЛЕННЯ ТА ПРЯМОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ БАКТЕРІЙ ГРУПИ КИШКОВОЇ ПАЛИЧКИ

Проаналізовано ріст бактерій групи кишкової палички на різноманітних хромогенних середовищах, призначених для одноетапного виділення та прямої ідентифікації. Обґрунтовано необхідність швидкого впровадження їх у лабораторну практику ветеринарної медицини.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз спеціалізованих джерел літератури показав, що за використання традиційних живильних диференційно-діагностичних середовищ ідентифікація ускладнюється різноманітністю й універсальністю цукролітичних та протеолітичних ферментів коліформних мікроорганізмів (вони часто спостерігаються у представників різних видів). Це зумовлює відносно невеликі відмінності щодо росту різних мікроорганізмів на традиційних середовищах.

Так, для диференціації основним важливим реактивом, що входить до складу середовища Ендо, є лужний фуксин, який знебарвлюється в середовищі при додаванні натрію сульфату. Крім того, наявність у середовищі цих реагентів зумовлює сповільнення росту грампозитивної мікрофлори. Бактерії, здатні ферментувати лактозу, збільшують кислотність середовища внаслідок утворення кінцевого продукту розщеплення – ацетилальдегіду. Останній, реагуючи із сульфатом натрію, сприяє появленню червоного забарвлення. Тому лактозопозитивні бактерії виростають у вигляді яскраво-рожевих і червоних колоній, часто з металевим зеленуватим блиском. Колонії бактерій, що не збуджують лактози, безбарвні або слабо забарвлені [1–3].

Залежно від таксономічного рівня виділяють хромогенні середовища групової, родової, видової та внутрішньовидової ідентифікації.

За завершеністю досліджень середовища одноетапної прямої ідентифікації поділяються на середовища первинної та заключної ідентифікації.

Живильним середовищем у мікробіології називають суміш компонентів складної або простої будови, яку застосовують для розмноження бактерій та інших мікроорганізмів у лабораторних або промислових умовах [1, 2].

У сучасній мікробіологічній практиці найчастіше використовують сухі живильні середовища, які виготовляють у промислових масштабах із триптичних гідролізатів дешевих нехарчових продуктів (рибних відходів, м'ясокісткового борошна, технічного казеїну тощо) й агару.

За цільовим призначенням живильні середовища поділяються на:

основні – ті, що застосовують для вирощування багатьох видів бактерій;

елективні – які призначені для вибіркового виділення та накопичення мікробів певного виду із матеріалів, що містять різноманітну сторонню мікрофлору. Створення таких середовищ ґрунтується на біологічних особливостях певних мікробів;

диференційно-діагностичні – які застосовують для розмежування окремих видів (або груп) мікроорганізмів. Принцип створення заснований на тому, що різні види бактерій різняться між собою за біохімічною активністю і мають неоднаковий набір ферментів для розщеплення субстратів, які входять до складу живильного середовища.

Наприкінці ХХ ст. у мікробіологічну практику ввійшли диференційні сере-

довища нового покоління – *хромогенні*, принцип дії яких базується на виявленні високоспецифічних ферментів у досліджуваних мікроорганізмів. Для визначення унікального ферменту і, відповідно, ідентифікації мікроорганізму, до складу середовища вводять хромогенний субстрат – речовину, при розщепленні якої цим ферментом утворюються забарвлені і/або флуоресцюючі продукти. У результаті хромогенне середовище контрастно змінює своє забарвлення або флуоресціює при виявленні певного мікроорганізму. Більшість хромогенних середовищ містять селективні добавки, що затримують ріст сторонньої мікрофлори [3].

Мета роботи – порівняти ростові властивості хромогенних живильних середовищ, які застосовують для одноетапного виділення та прямої ідентифікації коліформних мікроорганізмів різного виробництва і визначити перспективу їх використання у практичній діяльності бактеріологічних відділів державних лабораторій ветеринарної медицини.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У роботі використовували традиційні та нові хромогенні живильні середовища, власні дослідження і дані наукових публікацій. За умови систематичного підбору здійснювали відбір описової інформації, проводили критичну оцінку одержаних даних, їх сумачію, аналіз та інтерпретацію результатів.



Рис. 1. Ріст на середовищі Chromacult Coliform Agar (Merck): *E. coli* (сині), *Klebsiella pneumoniae* (червоні) та *Pseudomonas aeruginosa* (жовтуваті)

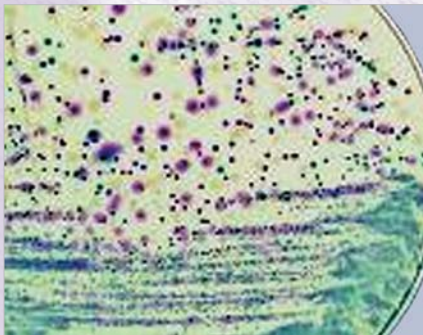


Рис. 2. Ріст на середовищі HiCrome ECC Selective Agar (Himedia): *E. coli* (сині), *Klebsiella pneumoniae* (червоні) та *Pseudomonas aeruginosa* (жовтуваті)

Наприклад, для прямої групової ідентифікації коліформних бактерій та видової ідентифікації *E. coli* із харчових продуктів, води, біологічного матеріалу використовують такі середовища: Chromacult Coliform Agar (Merck, Німеччина), HiCrome ECC Selective Agar (Himedia, Індія). Комбінація двох хромогенних субстратів дозволяє одночасно виявити коліформні бактерії та *E. coli*. Фермент β -галактозидаза, характерний для коліформних бактерій, розщеплює хромогенний субстрат Salmon-Gal, що призводить до забарвлення їхніх колоній у рожевий (червоний) (Chromacult Coliform Agar) або помаранчево-червоний колір (HiCrome ECC Agar). Фермент β -глюкуронідаза, характерний для *E. coli*, розщеплює хромогенний субстрат X-глюкуронід. *E. coli* має обидва ферменти, тому колонії забарвлюються в темно-синій (фіолетовий) колір, що чітко відрізняє кишкову паличку від колоній коліформ (рис. 1, 2). Ріст грампозитивних бактерій пригні-



Рис. 3. Ріст на середовищі HiCrome Coliform Agar w/SLS (Himedia): *E. coli* (сині), *Salmonella* серовару Enteritidis (безбарвні), *Enterobacter cloacae* (червоні – зверху) і *Citrobacter freundii* (червоні – знизу)

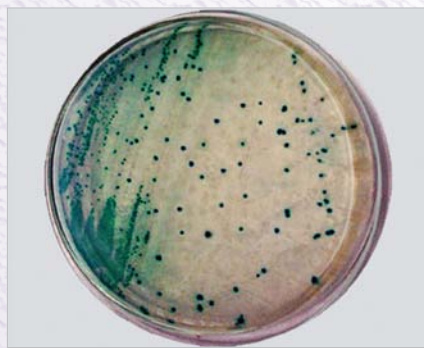


Рис. 4. Ріст *E. coli* та *Enterobacter aerogenes* на середовищі Rapid HiColiform Agar (Himedia): колонії *E. coli* під впливом ультрафіолетового опромінення дають блакитне світіння (флуоресценція)

чується тергітолом-7. Для підтвердження *E. coli* слід провести тест на індол. Але середовище не характеризується повною специфічністю (наприклад, *E. coli* O157:H7 не має β -галактозидази, а деякі штами сальмонел, шигел, ієрсиній її мають) [3, 4].

Схожий принцип одночасного виявлення *E. coli* та інших коліформних бактерій із харчових продуктів і води відзначають у середовища HiCrome Coliform Agar w/SLS (Himedia, Індія) (рис. 3). Додецилсульфат натрію пригнічує ріст грампозитивних бактерій. Триптофан, який входить до складу середовища разом із вищезазначеним хромогеном, поліпшує продукування кишковою паличкою індолу. Тому для підтвердження наявності *E. coli* слід нанести реагент Ковача на темно-синю або фіолетову колонію. Появу вишнево-червоного забарвлення розцінюють як позитивну реакцію [4, 5].

Для прямої ідентифікації коліформних бактерій та *E. coli* в рідкому

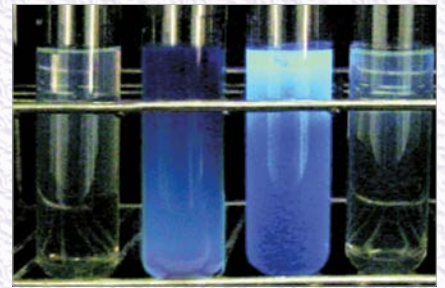


Рис. 5. Флуоресценція в повній темряві під впливом ультрафіолетового опромінення на середовищі Rapid HiColiform Broth (Himedia) (зліва направо): 1-ша пробірка – контроль (незасіяне середовище); 2-га – *Enterobacter aerogenes*; 3-тя – *E. coli*; 4-та – *Staphylococcus aureus*



Рис. 6. Ріст на середовищі HiCrome ECC Selective Agar (Himedia): *E. coli* (синьо-зелені), *Salmonella* (безбарвні)

середовищі використовували середовища Fluorocult LMX (Merck, Німеччина). Коліформні бактерії виявляють за розщепленням хромогенного субстрату X-Gal специфічним ферментом β -галактозидазою, що призводить до зміни кольору середовища зі світло-жовтого на синьо-зелений. *E. coli* визначають за розщепленням флуорогенного субстрату MUG ферментом β -глюкуронідазою, в результаті чого утворюється флуоресціюючий в УФ-випроміненні продукт реакції. Постановка тесту на індол з реактивом Ковача в цій же пробірці дає можливість надійно ідентифікувати *E. coli* [3].

Rapid HiColiform Agar / Broth для коліформних бактерій та *E. coli* (Himedia, Індія) має схожий принцип виділення цих мікроорганізмів (рис. 4, 5) [5].

HiCrome *E. coli* Agar (Himedia, Індія) готується на основі жовчно-триптонного агару для швидкого й ефективного виявлення *E. coli* у харчових продуктах [5]. Більшість штамів *E. coli* можна відрі-



нити від інших коліформних бактерій за наявністю глюкуронідази – високо-специфічного для кишкової палички ферменту [3, 4]. Хромогенний субстрат X-глюкуронід дозволяє встановити глюкуронідазну активність. Клітини *E. coli* сорбують X-глюкуронід, внутрішньоклітинна глюкуронідаза розщеплює зв'язок між глюкуронідом та хромофромом, який, звільнюючись, забарвлює колонії *E. coli* в синьо-зеленуватий колір (рис. 6). Ферментативний гідролізат казеїну і спеціальний пептон задовольняють потреби бактерій у необхідних факторах росту. Солі жовчних кислот сповільнюють ріст грампозитивної мікрофлори. Фосфати підтримують постійний рівень рН середовища, а хлористий натрій забезпечує його ізотонічність.

До хромогенних середовищ внутрішньовидової ідентифікації відносять живильні середовища для ентерогеморагічного штаму *E. coli* O157:H7 – Fluarocult HC Agar acc. to SZABO та CT-Sorbitol MacConkey Agar (Merck, Німеччина). Вони призначені для виділення цих мікроорганізмів із харчових продуктів та клінічного матеріалу. До складу середовища Fluarocult HC Agar входить сорбіт з індикатором бромкрезоловим пурпурним та хромогенний субстрат 4-метилумбеліферил-β-глюкуронід, який розщеплюється β-глюкуронідазою з утворенням флуоресцюючого 4-метилумбеліферону. Ріст грампозитивної мікрофлори сповільнюється солями жовчних кислот. На відміну від інших кишкових паличок штам *E. coli* O157:H7 не ферментує сорбіту та не має β-галактозидази. Після інкубації посівів протягом 16–24 год за температури 41°C результат ураховують у два етапи: спочатку реєструють сорбітнегативні колонії (незабарвлені), після чого опромінюють УФ-світлом та відзначають нефлуоресцюючі колонії. Живильне середовище CT-Sorbitol MacConkey Agar містить середовище MacConkey, сорбітол і суплемент СТ (цефиксим та телурит калію). Після інкубації посівів протягом 16–24 год за температури 37°C фіксують ріст незабарвлених (сорбітнегативних) колоній. Відібрані нефлуоресцюючі, незабарвлені колонії додатково

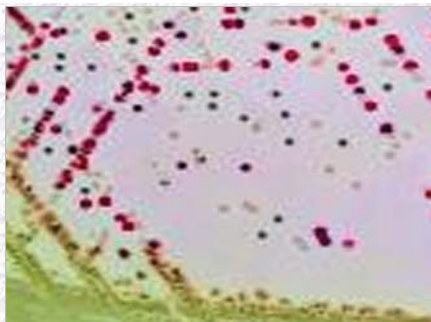


Рис. 7. Ріст на середовищі HiCrome MacConkey Sorbitol Agar Base Agar (Himedia): *E. coli* (синьо-зелені, червоні), *E. coli* O157:H7 (безбарвні)

перевіряють аглютинуючими сироватками до *E. coli* O157:H7 [3].

HiCrome MacConkey Sorbitol Agar Base Agar (Himedia, Індія) готується відповідно до пропису F. Rappaport та E. Henigh. У його складі лактозу замінено на сорбіт, оскільки ентерогеморагічні штами *E. coli* O157:H7 ферментують лактозу, а не сорбіт, і тому формують на цьому середовищі безбарвні колонії.

Штами *E. coli*, які ферментують сорбіт, утворюють рожево-червоні колонії. Червоне забарвлення обумовлене реакцією індикатора нейтрального червоного, через те що кислі продукти розщеплення сорбіту створюють кисле рН середовища (менше 6,8). Індикатор В.С. додається до складу середовища для встановлення β-D-глюкуронідазної активності звичайних *E. coli*, які на такому середовищі формують синьо-зелені колонії. *E. coli* O157:H7 не виявляє β-D-глюкуронідазної активності [4, 5]. Штами *E. coli*, ферментуючи сорбіт та володіючи β-D-глюкуронідазною активністю, утворюють колонії синьо-зеленого кольору (рис. 7).

ВИСНОВКИ

1. Традиційні диференційно-діагностичні середовища не забезпечують прямої ідентифікації бактерій. Для остаточного визначення необхідно отримати чисту культуру мікроорганізмів та провести низку додаткових тестів (встановити морфологічні, тинкторіальні, біохімічні, біологічні властивості культури тощо).

2. При застосуванні хромогенних середовищ виявити бактерії групи

кишкової палички можна вже через добу від початку дослідження. Іноді необхідно провести 1–2 швидких підтверджувальних тести протягом кількох годин після отримання росту культури, при цьому зменшуються обсяги робіт та матеріальні затрати на здійснення досліджень.

СПИСОК

ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Загальні** методи лабораторних досліджень в лабораторіях ветеринарної медицини: метод. рекомендації для лікарів-бактеріологів лабораторій ветеринарної медицини / [уклад. В.М. Івченко, Г.М. Денисенко та ін.]. – Біла Церква: Білоцерківський ДАУ, 2003. – 65 с.
2. **Коротаєв А.И.** Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А.И. Коротаєв, С.А. Бабичев. – СПб.: Спец. литература, 1998. – 592 с.
3. **Сиволодский Е.П.** Систематика и идентификация энтеробактерий / Е.П. Сиволодский – [2-е изд.]. – СПб.: Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, 2008. – 44 с.
4. **HiCrome TM** / Экспресс-диагностика. Дифференциация микроорганизмов в первичном посеве. – М.: ХайМедиа Лабораториз Пвт. Лтд., 2009. – 37 с.
5. **The HiMedia Manual for microbiology and cell culture laboratory practice.** – India: HiMedia Laboratories Pvt. Limited, 2003. – 675 p.

Одержано 10.03.2011

Сравнительная характеристика хромогенных сред одноэтапного выделения и прямой идентификации бактерий группы кишечной палочки. Т.А. Гаркавенко

В статье дан анализ роста бактерий группы кишечной палочки на хромогенных средах разного производства, предназначенных для одноэтапного выделения и прямой идентификации. Обоснована необходимость их быстрого внедрения в лабораторную практику.

Comparative characteristics of chromogenic mediums single-stage separation and direct identification for coliform. Т.А. Garkavenko

This article describes the analysis of bacterial growth of Coliform on chromogenic media for a single-stage separation and the direct identification of different manufacturers and their need for rapid introduction into laboratory practice. ◉