

УДК 619:579

Т. О. ГАРКАВЕНКО, кандидат ветеринарних наук,¹

Л. В. МАЛЯР,²

Н. Я. МЕХ, аспірант^{1,1},

Т. О. ДЯЧЕНКО¹

¹Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Київ

²Полтавська РДЛВМ

РІДКІ СЕЛЕКТИВНІ СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ВИДІЛЕННЯ САЛЬМОНЕЛ, ЕФЕКТИВНІСТЬ ЇХ ВИКОРИСТАННЯ

У статті викладено результати перевірки та порівняння ростових властивостей рідких селективних середовищ для виділення сальмонел різних виробників.

Ключові слова: сальмонельоз, Salmonella spp., продуктивність, селективність, середовища.

Проблеми, що пов'язані з безпечністю харчових продуктів, включають глобалізацію торгівлі харчовими продуктами, зміну стилю життя, міжнародні поїздки, забруднення навколишнього середовища, а також стихійні лиха та техногенні катастрофи.

Сальмонельоз є однією з найбільш поширених хвороб харчового походження. За оцінками ВООЗ, у світі щорічно трапляються десятки мільйонів випадків захворювання людей, а в більше, ніж сотні тисяч випадків, хвороба закінчується летально [6].

На сьогоднішній день виявлено більше 2500 різних видів *Salmonella* («серотипів» або «сероварів»). *Salmonella spp.* є поширеною і досить стійкою у зовнішньому середовищі бактерією, вона може зберігатись протягом кількох тижнів у сухому середовищі і кілька місяців у воді [5].

Класичним методом виявлення сальмонел із харчових продуктів є бактеріологічний з використанням селективних і диференційно-діагностичних середовищ. Селективні – це середовища, які завдяки своєму складу забезпечують особливо сприятливі умови для розмноження певного виду мікроорганізмів, одночасно частково чи повністю пригнічуючи ріст інших мікроорганізмів. Диференційно-діагностичні – це середовища, які підтримують ріст певних мікроорганізмів, сповільнюючи ріст інших [2].

Сьогодні на ринку існує безліч компаній-виробників поживних середовищ, промислове виробництво яких проводиться відповідно до нормативно-правових актів, що регулюють саме виробництво.

Мета роботи – перевірити ростові властивості рідких селективних середовищ для виявлення сальмонел різних виробників, які використовуються при проведенні досліджень методом ISO 6579 (ДСТУ ISO 6579), та порівняти їх хімічний склад.

¹ Науковий керівник: д. вет. н., проф. Яблонська О. В.

Матеріали та методи. При проведенні досліджень використовувалось обладнання та наступні матеріали – апарат для сухої та вологій стерилізації, термостати, рН-метр, вортекс, пробірки або флакони, градуйовані піпетки, чашки Петрі, стерильні петлі.

Для виділення сальмонел відповідно до ISO 6579 (ДСТУ ISO 6579) застосовують наступні рідкі селективні середовища: новобіюцинове середовище Рапапорта-Василіадіса із соєю (RVS) та тетратіонативий бульйон Мюллера-Кауффмана (МКТТн) [3]. При висіві зразків на вище наведені середовища відбувається «збагачення» вихідного (первинного) зразку, тобто кількість сальмонел збільшується, а ріст сторонньої мікрофлори пригнічується.

Селективну ізоляцію сальмонел згідно методу ISO 6579 (ДСТУ ISO 6579) проводили на ксиліозо-лізин дезоксихолатному (XLD) та діамантовому зеленому (ДЗА) агарах. Оптимальні умови для культивування мікроорганізмів на цих середовищах – $37\pm 1^\circ\text{C}$ протягом 24 ± 3 год. Колонії, утворені мікроорганізмами роду *Salmonella*, на агарах XLD та ДЗА, згідно сертифікатів якості виробників, повинні мати S-форму, рожевий або малиновий колір, колір середовища під колоніями повинен змінюватися на рожевий, для XLD агару характерним є також утворення в колоніях чорного центру.

Оцінку продуктивності та селективності поживних середовищ RVS та МКТТн проводили згідно стандарту ISO/TS 11133 – 2 (ДСТУ ISO 11133), використовуючи добові еталонні тест-культури *Salmonella typhimurium* 371 та *Escherichia coli* 055 К 59 № 3912/41. Суспензії мікроорганізмів з певною концентрацією клітин в одиниці об'єму готували з використанням оптичного стандарту мутності (ОСМ). Порівняльний контроль бульйонів для накопичення сальмонел проводився напів'якісним методом (рис.1).

Продуктивність середовища для селективного накопичення вважається прийнятною, якщо на диференційно-діагностичних агарах виявлено не менше 10 колоній цільових мікроорганізмів (*S. typhimurium*). До того ж, характеристики колоній повинні збігатися з вимогами сертифікатів якостей виробників. Селективність бульйонів задовольняє вимоги ISO/TS 11133-2 (ДСТУ ISO/TS 11133-2), якщо інтенсивність росту нецільових штамів (*E. coli*) оцінюється в «0» балів (повне пригнічення) [2].

Результати власних досліджень. В основу методу виділення сальмонел за ISO 6579 (ДСТУ ISO 6579) покладено метод накопичення культур на селективних поживних середовищах, розроблений С. Н. Виноградським та М. Бесринком, з послідовним висівом на диференційно-діагностичні середовища. Для цього методу характерна стадійність: неселективне (з метою відновлення пошкоджених клітин мікроорганізмів) та селективне (накопичення цільових мікроорганізмів) збагачення з наступною індикацією сальмонел на диференційно-діагностичних агарах, отримання чистих культур, їх біохімічна та серологічна ідентифікація. При цьому виділення чистих культур *Salmonella* spp. створює специфічні умови: джерела енергії, вуглецю та азоту, акцептори електронів, температуру, рН тощо. Все це сприяє бурхливому росту цільових мікроорганізмів [4].

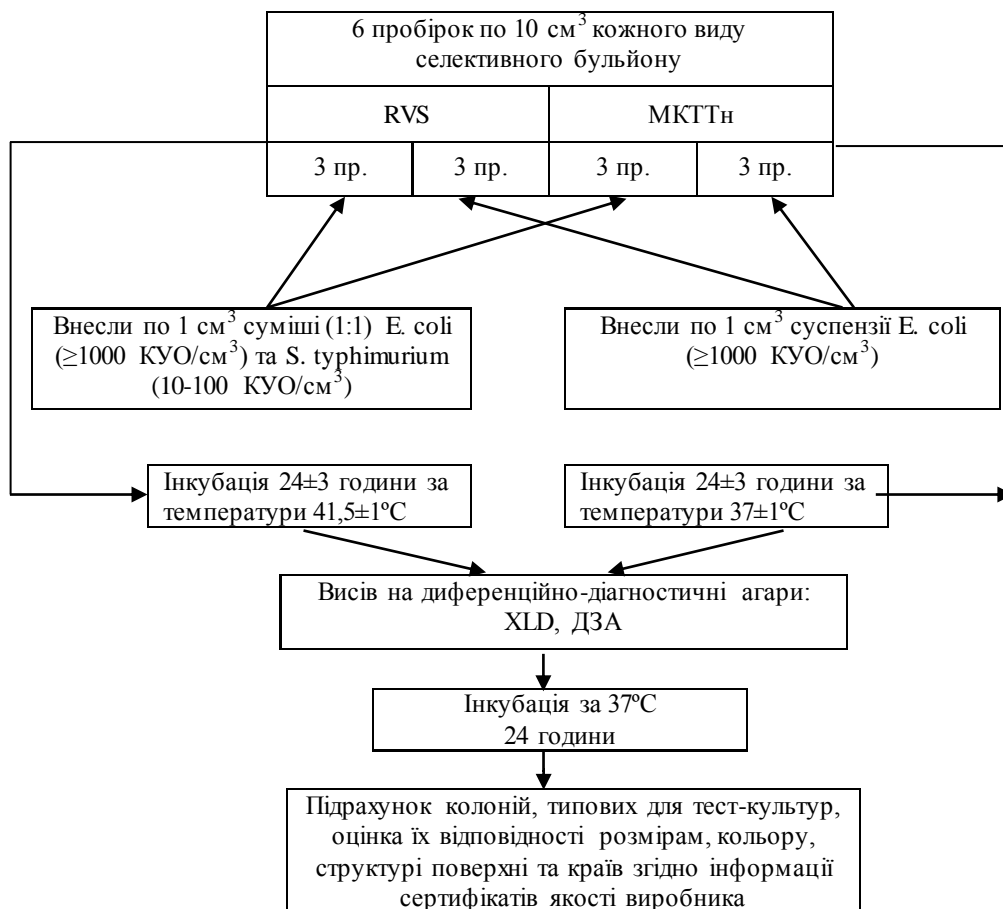


Рис.1. Схема перевірки рідких поживних середовищ для виділення сальмонел на ростові властивості.

Застосування аналогічних рідких середовищ (RVS та МКТТн) різних виробників створило необхідність проведення порівняння їх продуктивності та селективності. Результати випробувань викладені в табл. 1.

При оцінці результатів дослідження на XLD агарі відмічався ріст колоній сальмонел з чорним центром по всій лінії нанесення зі зміною кольору середовища до яскраво-рожевого. На ДЗА агарі спостерігали колонії сальмонел світло-рожевого кольору. При обліку росту тест-культури *E. coli* на XLD та ДЗА агарі спостерігались колонії яскраво-жовтого кольору.

Виходячи з даних табл. 1, робимо висновок, що продуктивність бульйонів RVS, МКТТн практично однакова та відповідає вимогам ISO/TS 11133-2 (ДСТУ ISO/TS 11133-2). Селективність же бульйону RVS можна вважати незадовільною, оскільки не відбувалося пригнічення росту нецільового мікроорганізму.

Проводячи дослідження харчової продукції, було помічено, що при виділенні *Salmonella* на вище наведених середовищах відмічається поява колоній R-форми. Під час ідентифікації таких колоній виявилось, що біохімічні реакції є характерними для роду *Salmonella*, а от серотипування провести не вдалося.

виділені штами або не взаємодіяли з комплексними сироватками, або проявляли спонтанну аглютинацію. Згідно вимог ISO 6579 (ДСТУ ISO 6579), колонії, що мають характерні біохімічні і нехарактерні серологічні властивості, розглядаються як «можливо сальмонела». Це вимагає їх подальшої розширеної ідентифікації в референтних лабораторіях.

Таблиця 1

Результати порівнювання продуктивності та селективності рідких поживних середовищ для виділення сальмонел

№ з/п	Назва середовища	Виробник	Еталонний штам	Показник	Наявність росту на селективному агарі	Характеристика колоній
1.	RVS	<i>BioMerieux</i>	Суміш (1:1): Salmonellatyphimurium 371 (10-100 КУО/см ³) та Escherichiacoli 055R 59 (≥1000 КУО/см ³)	Продуктивність	≥ 10 КУО	Характеристики колоній відповідають сертифікату якості
		інших виробників				
2.	RVS	<i>BioMerieux</i>	Escherichia coli 055R 59 (≥1000 КУО/см ³)	Селективність	≥ 10 КУО	Характеристики колоній відповідають сертифікату якості
		інших виробників				
3.	МКТТн	<i>BioMerieux</i>	Суміш (1:1): Salmonellatyphimurium 371 (10-100 КУО/см ³) та Escherichiacoli 055R 59 (≥1000 КУО/см ³)	Продуктивність	≥ 10 КУО	Характеристики колоній відповідають сертифікату якості
		інших виробників				
4.	МКТТн	<i>BioMerieux</i>	Escherichia coli 055R 59 (≥1000 КУО/см ³)	Селективність	Ріст відсутній	-
		інших виробників				

Поява R-форм колоній має назву «явища R-S дисоціації». Дисоціація бактерій – це розщеплення однорідної популяції бактерій на варіанти. Від випадкових мутацій вона відрізняється частотою виникнення та постійним характером змін генетичних, фізико-хімічних та морфологічних властивостей. На щільних середовищах замість колоній гладенького (S) типу з'являються зморшкуваті колонії R-форми. Причини дисоціації: тривале культивування, культивування в несприятливих умовах, виділення з зовнішнього середовища тощо. Змінюється не лише форма колоній, змінюються фізико-хімічні властивості поверхневих структур клітин, відбувається зниження ферментативної активності, рухливості, антигенності.

Виходячи з вище зазначеного припустили, що стрес-фактором стали самі поживні середовища. Для підтвердження провели порівняння та проаналізували якісний та кількісний склад поживних середовищ різних фірм-виробників. Порівняльний аналіз складу бульйонів викладено в табл. 2.

Таблиця 2

Аналіз складових компонентів середовища Рапапорта - Васіліадіса виробництва BioMerieux та інших виробників

№ з/п		Склад бульйону згідно ISO 6579	Бульйон Рапапорта-Васіліадіса (RVT) фірми BioMerieux	Бульйон Рапапорта-Васіліадіса (RVS) інших виробників
	<i>Назва компоненту</i>	<i>Кількість компоненту/дм³</i>		
1.	Ферментативний гідролізат сої	4,5	4,5	4,5
2.	Натрію хлорид	7,2	7,2	7,2
3.	Калію фосфат	1,44	1,4	1,44
4.	Магнію хлорид	13,4	16,2	36,0
5.	Малахітовий зелений	0,036	0,033	0,036
6.	pH готового до застосування середовища	5,2 ± 0,2	5,5	5,2±0,2

Перша і одна з найголовніших відмінностей складу середовищ – походження білкового гідролізату, що є джерелом азоту та вуглецю. Фірма BioMerieux використовує казеїновий пептон, який є гідролізатом тваринного білку. Інші ж компанії застосовують, як цього вимагає ISO 6579 (ДСТУ ISO 6579), папайновий гідролізат сої – білок рослинного походження. Порівняння хімічного складу білкових гідролізатів, за даними компанії Merck, викладено в табл. 3.

Таблиця 3

Хімічний склад пептонів тваринного та рослинного походження

№ з/п	Хімічна складова	Вміст хімічної складової	
		Пептон з казеїну	Пептон з сої
1	Загальний азот	> 12-13,5 %	> 9,0 %
2	Зола	≤ 5 – 15,0 %	≤ 15,0 %
3	Азот амінокислотний	4,7 – 6,7 %	1,8 – 3,2 %
4	Натрій хлористий	< 1,8 %	< 2 %
5	Залізо	0,002 %	0,05 %
6	Загальні вуглеводи	0,4 %	0,24 %

Порівнюючи хімічний склад пептонів, робимо висновок: гідролізат тваринного білку містить більше азоту амінокислотного та, відповідно, і загального азоту, а також вуглеводів, і менше золи порівняно з рослинними гідролізатами.

Наступна, не менш важлива, відмінність у складі бульйонів – концентрація селективних агентів, зокрема, магнію хлориду ($MgCl_2$). Магній хлорид виконує функцію підтримання певного рівня осмотичного тиску в середовищі. Осмотичний тиск, (осмос) – це процес одnobічної дифузії крізь напівпроникну мембрану молекул розчинника в бік більшої концентрації розчиненої речовини. Величина осмосу залежить від кількості речовини, а не від її природи [1]. Вміст $MgCl_2$ в бульйоні RVS із рослинним компонентом у 2,2 рази вище, ніж в середовищі компанії BioMerieux. Це означає, що осмотичний тиск середовища RVS може згубно впливати не лише на сапрофітну мікрофлору, а й на самі сальмонели.

Важливе значення для росту та розвитку бактерій має стабільність рН поживного середовища. Виходячи з даних табл. 2, бульйон RVS (виробництва BioMerieux) має сталі значення рН 5,5, тоді як рН середовища RVS інших виробників коливається в межах 5,0-5,4. Лише при оптимальній та стабільній реакції середовища, що впливає на проникливість оболонки (клітинної стінки та цитоплазматичної мембрани), мікроорганізми можуть засвоювати поживні речовини. Навіть найменші коливання водневого показника призводять до порушень обміну речовин між середовищем та мікробною клітиною.

Залишилося відкритим питання, чому штам *Salmonella typhimurium* 371, який використовується для перевірки ростових властивостей поживних середовищ, не піддавався R-S-дисоціації на бульйонах із рослинним компонентом. Відповідь лише одна: склад середовища «підганяється» під властивості штамів, які найчастіше використовуються для контролю їх якості. Еталонні штами мікроорганізмів є стабільними та стійкими до впливу несприятливих факторів (селективних компонентів поживних середовищ) внаслідок штучного відбору на відміну від «польових» штамів, які виділялися із природно контамінованих зразків.

Усі середовища фірми BioMerieux мають збалансований та стабільний склад, що забезпечує інтенсивний ріст вимогливої цільової мікрофлори.

Висновки:

1. Продуктивність бульйонів різних виробників RVS та МКТТн практично однакова та відповідає вимогам ISO/TS 11133-2 (ДСТУ ISO/TS 11133-2).

2. Селективність бульйону МКТТн є задовільною, а RVS – незадовільною згідно стандарту. Тому при дослідженні на виявлення *Salmonella* spp. слід використовувати не менше двох рідких селективних середовищ.

3. При аналізі складових компонентів середовища Рапапорта-Васіліадіса-виробництва *BioMerieux* та інших виробників основною відмінністю є походження білкового гідролізату, що є джерелом азоту та вуглецю. Фірма BioMerieux використовує казеїновий пептон, який є гідролізатом тваринного білку, а інші компанії застосовують папаїновий гідролізат сої – білок рослинного походження, а також є відмінним у концентрації селективних агентів, зокрема, $MgCl_2$, який виконує функцію підтримання осмотичного тиску.

4. Порівнявши хімічний склад пептонів тваринного та рослинного походження, робимо висновок, що гідролізат тваринного білку містить більше азоту амінокислотного та відповідно загального азоту, а також загальних вуглеводів, і менше золи порівняно з рослинними гідролізатами.

5. При дослідженні слід звертати увагу на R-форми колоній, так як дуже часто вони підтверджуються як представники роду *Salmonella*.

Список використаної літератури:

1. Детлаф А.А., Яворский Б.М. Курс физики: Учебное пособие для вузов. – Москва: Высшая школа, 1989 – 113 с.
2. ISO/TS 11133-2:2003 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Настанови щодо готування та виробництва поживних середовищ. Частина 2. Практичні настанови щодо випробування культуральних середовищ.
3. ISO 6579:2002 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Методика виявлення *Salmonella* spp.
4. Поздеев О. К. Медицинская микробиология: учебное пособие / Под ред. В.И. Покровского. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2008. – 765 с.
5. Сальмонелла (небрюшнотифозная). Информационный бюллетень № 139 Август 2013 г. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/ru/index.html>.
6. Троцький М. С. Сальмонельоз птахів основна причина сальмонельозу людей // Тваринництво сьогодні. – 2012. – №2. – С.34 – 37.

ЖИДКИЕ СЕЛЕКТИВНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ, ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ / Т. А. Гаркавенко, Л. В. Маляр, Н. Я. Мех, Т. А. Дяченко.

В статье изложены результаты проверки и сравнения ростовых свойств жидких селективных сред для выделения сальмонелл различных производителей. Доказано, что селективность среды Раппорта-Василиадиса с соей (RVS) разных производителей, не в полной мере соответствует требованиям стандарта ISO 6579 (ДСТУ ISO 6579). При исследовании на наличие сальмонелл особое внимание нужно уделять колониям с R-формой, поскольку после накопления на селективных средах происходит «явление R-S диссоциации»

Ключевые слова: сальмонеллез, Salmonellaspp., производительность, селективность, среды.

LIQUID SELECTIVE MEDIUMS FOR ISOLATION OF SALMONELLA, THEIR EFFECTIVE USE / T.Garkavenko, L. Maljar, N. Mekh, T. Dyachenko.

The article presents the results of testing and comparing the growth properties of liquid selective mediums for the isolation of Salmonella from different manufacturers. It is proved that the selectivity of the medium - Rapaport Vasiliadis with soya (RVS) from different manufacturers do not fully comply with the requirements of ISO 6579 (DSTU ISO 6579). In the study for salmonella special attention should be paid to the colonies to the R- form, because after accumulating on selective mediums is a " phenomenon R-S dissociation".

Keywords : salmonellosis , Salmonella spp., Productivity , selectivity, medium.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук Г.В. Київська

Рукопис надійшов 27. 02. 014 року.