

ROZA WOJTKOWSKA-UMIŃSKA, FELICJA OSTAPCZUK

BADANIA PORÓWNAWCZE NAD ZASTOSOWANIEM  
DWÓCH ODMIENNYCH METOD FERMENTACJI PROBÓWKOWEJ  
DO WYKRYWANIA BAKTERII COLI  
W WODZIE STUDZIENNEJ \*

Z Zakładu Higieny Wsi Instytutu Medycyny Pracy  
i Higieny Wsi w Lublinie

*Stwierdzono, że metoda wykrywania bakterii grupy coli, polecana przez Buttiaux, w zastosowaniu do wody studziennej, pozwala na uzyskanie wyników nie mniej dokładnych niż wyniki uzyskane metodą używaną rutynowo w naszym kraju, natomiast wyraźnie skraca czas pracy.*

WSTĘP

Sprawa standaryzacji metod badania wody jest niewątpliwie aktualna i ważna. W Anglii i Stanach Zjednoczonych (1) pracownie zdrowia publicznego posługują się metodami standardowymi, ciągle unowocześnianymi; we Francji do roku 1958 panowała w tej dziedzinie różnorodność metod badania. Dotyczyła ona również interpretacji wyników badań.

W roku 1958 zostały we Francji zapoczątkowane prace nad standaryzacją metod bakteriologicznego badania wody pitnej. Duże zasługi położył na tym polu R. Buttiaux. Opierając się na wynikach ankiety, przeprowadzonej przez ministerstwo zdrowia w departamentalnych laboratoriach, opracował on zestawienie najczęściej stosowanych we Francji metod.

Następnie Buttiaux poddał powyższe metody doświadczalnym badaniom porównawczym i opracował projekt standardowej metodyki bakteriologicznego badania wody (2, 3).

Proponowana przez Buttiaux metodyka obejmuje następujące elementy:

- I. Badanie ilościowe tzw. „całkowitej” ilości bakterii.
- II. Wykrywanie i oznaczanie ilościowe bakterii grupy coli, ze szczególnym uwzględnieniem *Escherichia coli*.
- III. Badania na obecność paciorkowców kałowych.
- IV. Badanie w kierunku bakterii z rodzaju *Clostridium* redukujących siarczany, ze szczególnym uwzględnieniem *Clostridium perfringens*.
- V. Wykrywanie obecności bakteriofagów kałowych (*anti coli* i *schigella*).

Ujednostajniona metodyka bakteriologicznego badania wody, opracowana przez Państwowy Zakład Higieny (4, 5), opisana przez Przesmyckiego (6), ogranicza się do badania ogólnej liczby bakterii oraz do wykrywania bakterii grupy coli, ze szczególnym uwzględnieniem *E. coli*.

\*) Metoda stosowana w naszym kraju i we Francji (Buttiaux).

Zakres badań bakteriologicznych wody, polecanych przez *Buttiaux*, jest więc znacznie szerszy w porównaniu z badaniami prowadzonymi rutynowo w naszym kraju.

Metodyka badań wody w kierunku bakterii grupy *coli* wg *Buttiaux* przewiduje stosowanie dwu równorzędnych metod.

I. Metoda, polegająca na sączeniu wody przez sączki membranowe „Co 5”, lub „*Millipore filters*” oraz hodowli na podłożu różnicującym (agar z laktozą, Trgitołem 7 i trójfenylotetrazoliną) w temp. 37° w ciągu 24 godz. (bakterie grupy *coli*) i w temp. 44° w ciągu 16—24 godz. (*E. coli*) (7).

II. Fermentacyjna metoda próbowkowa (stosowana w pracy niniejszej), składa się z trzech etapów:

A. Próba wstępna — posiew na zmodyfikowane podłoże Eijkmana z purpurą bromokrezolową, hodowla w temp. 30°, 24 i 48 godz.

B. Próba potwierdzająca — przesiew na stałe podłoże różnicujące Teaque-Levina, hodowla w temp. 30°, 24 i 48 godz.

C. Ostateczne stwierdzenie bakterii grupy *coli* — posiew z podłoża Teaque-Levina na następujące podłoża:

1. Podłoże Kliglera (potwierdzenie zdolności fermentowania laktozy i glukozy), hodowla w temp. 30°, 24 godz.

2. Agar 15% (badanie ruchliwości szczepów), hodowla w temp. 30°, 24 godz.

3. Agar skośny, hodowla w temp. 30° w ciągu 24 godz., po czym przesiew na następujące podłoża:

a) Podłoże Fouada (2 próbki na każdą próbę wody); po 24 godz. hodowli w temp. 30° — reakcja Voges-Proskauera, po 48 godz. hodowli w temp. 30° — reakcja z czerwienią metylową.

b) Woda peptonowa — po 24 godz. hodowli w temp. 30° badanie zdolności wytwarzania indolu.

c) Podłoże cytrynianowe Simmonsa — hodowla w temp. 30°, 24 godz.

Celem szybkiej identyfikacji *E. coli*, *Buttiaux* (8) poleca przesiew prób reagujących dodatnio w posiewie wstępnym na dwa podłoża płynne: laktoza z żółcią i zielenią brylantową oraz wodę peptonową. Po 24 i 48 godz. hodowli na podłożu laktozowym z żółcią w temp. 44° dokonuje się odczytu. Z kulturą na wodzie peptonowej (24 i 48 godz. w temp. 44°) wykonuje się próbę na wytwarzanie indolu.

Jak wynika z przytoczonych danych, fermentacyjna metoda próbowkowa opisana przez *Buttiaux* różni się znacznie od metody rutynowo stosowanej u nas, zarówno pod względem podłoży (Teaque-Levina, Fouada, modyfikowane podłoże Eijkmana z purpurą bromokrezolową), jak i temperatur hodowli (30°). Nowym elementem jest, nie mająca odpowiednika w metodyce stosowanej w naszym kraju, próba Mackenziego, Gilberta i Taylora.

Podstawowym założeniem pracy niniejszej było równoległe przebadanie obiema metodami pewnej ilości prób wody w kierunku bakterii *coli* celem stwierdzenia, która z nich pozwala na uzyskanie dokładniejszych wyników.

## BADANIA WŁASNE

### I. Materiał i metody

Do badań użyto 189 prób wody studziennej z terenów wiejskich (5 prób ze studzien wierconych, 184 — ze studzien kopanych). Wodę pobierano

do jałowych słoików w ilości 250 ml z każdej studni, po czym próby przewożono samochodem do laboratorium.

Posiewy wstępne wykonywano w 4—6 godz. po pobraniu wody. Badania prowadzono równolegle dwiema metodami: metodą rutynowo stosowaną u nas, oraz fermentacyjną metodą probówkową polecaną przez Instytut Pasteura w Lille \*).

Porównania dwu metod oznaczania bakterii grupy coli w wodzie dokonano zestawiając ilości poszczególnych szczepów wyizolowanych przy pomocy tych metod.

Ponadto, celem uzyskania dokładniejszej charakterystyki tych metod, dokonano porównania następujących, różniących je między sobą elementów:

1. Porównanie zdolności fermentacyjnych bakterii grupy coli w temp. 30° i 37°.

W badaniach tych, zarówno w temp. 30°, jak i 37° stosowano zmodyfikowane podłoże Eijkmana z czerwienią obojętną (z metodyki Buttiaux wzięto tylko temp. hodowli 30°, nie zastępując czerwieni obojętnej purpurą bromokrezolową).

2. Porównanie wzrostu bakterii grupy coli na agarze Endo (37°) i na agarze Teaque-Levina (30°).

3. Porównanie właściwości biochemicznych bakterii grupy coli, hodowanych w temp. 30° i 37°.

4. Porównawcze zastosowanie dwu podłoży (Fouada i Clarka) dla reakcji z czerwienią metylową i reakcji Vigés-Proskauera.

W ramach pracy niniejszej przeprowadzono dodatkowe badania w kierunku wyznaczenia najodpowiedniejszego czasu hodowli grupy coli na podłożu Fouada w temp. 30°, przed wykonaniem reakcji Vigés-Proskauera i reakcji z czerwienią metylową.

Do badań wprowadzono ponadto próbę Mackenziego, Gilberta, Taylora celem dokonania jej oceny jako metody szybkiej identyfikacji *E. coli*.

## II. Omówienie wyników badań

W tabeli I zestawiono ilości poszczególnych szczepów grupy coli, wyizolowanych za pomocą metody rutynowo stosowanej w naszym kraju (P) oraz metody Buttiaux polecaniej przez Instytut Pasteura w Lille (F).

Jak wynika z tabeli, metodą P uzyskano podobny odsetek szczepów *B. coli* I, jak metodą F (odpowiednio: 10,3% i 9%). Natomiast odsetek szczepów *B. coli* II wyizolowanych metodą P jest znacznie wyższy (20,0%) w porównaniu z analogicznymi szczepami wyizolowanymi metodą F (16,8%). Ponadto metodą P wyizolowano dość znaczny odsetek szczepów *A. aerogenes* I i II (13,1), podczas gdy metodą F nie wyizolowano w ogóle szczepów tego typu.

Metodą F natomiast uzyskano większy odsetek szczepów pośrednich typu I i II (58,8% i 13,8%) w porównaniu z metodą P (45,5% i 11,8%). Ponadto metodą tą wyizolowano 1 szczep *B. cloacae*.

Badania nad zastosowaniem próby Mackenziego, Gilberta, Taylora (MGT) do szybkiej identyfikacji *B. coli* I wykazały, że próba ta dała znacznie wyższy odsetek tych szczepów (21,0%) w porównaniu z metodami P i F.

\*) Panu prof. dr R. Buttiaux składam serdeczne podziękowanie za okazaną pomoc i życzliwość.

T a b e l a I

Wykaz szczepów grupy *coli*, wyizolowanych metodą P i metodą F.\*

Rodzaj szczepu	Rodzaj metody			
	Metoda P		Metoda F	
	Liczba	%	Liczba	%
<i>B. coli</i> typ I . . . . .	12	10,3	13	9,9
<i>B. coli</i> typ II . . . . .	23	20,0	22	16,8
Pośredni typ I . . . . .	52	45,5	77	58,8
Pośredni typ II . . . . .	13	11,4	18	13,8
<i>A. aerogenes</i> typ I . . . . .	4	4,0	—	—
<i>A. aerogenes</i> typ II . . . . .	10	9,1	—	—
<i>B. cloacae</i> . . . . .	—	—	1	0,7
Ogółem wyizolowano szczepów . . . . .	133	100	150	100
Ogólna liczba szczepów zidentyfikowanych	114	85,7	131	87,3
Ogólna liczba szczepów niezidentyfikowa- nych . . . . .	19	14,3	19	12,7

\*) Zgodnie z klasyfikacją *Wilsona* i *Milesa* (1946), cyt. wg *Buczowskiej* (9).

Jednakże należy podkreślić, że wszystkie szczepy *B. coli* I, określone wyżej wymienionymi metodami znalazły potwierdzenie w próbie MGT.

Wyniki badań porównawczych, dotyczących zdolności fermentacyjnych bakterii grupy *coli*, hodowanych na zmodyfikowanym podłożu Eijkmana z czerwienią obojętną w temp. 30° i 37° przedstawia tabela II.

T a b e l a II

Porównanie zdolności fermentacyjnych bakterii grupy *coli*, hodowanych w temp. 30° i 37°

Ilość prób wody przebadanych równoległe w temp. 30° i 37°		Ilość prób o wynikach zgodnych w temp. 30° i 37°		Próby o wynikach niezgodnych w temp. 30° i 37°					
				Ogółem		Próby o fermentacji wyższej w temp. 30°		Próby o fermentacji wyższej w temp. 37°	
L*)	%	L	%	L	%	L	%	L	%
189	100	62	32,8	127	67,2	87	46,0	40	21,2

\*) L — liczba.

Dla 32,8% prób wody uzyskano wyniki zgodne w obu temperaturach (stwierdzono fermentację w jednakowych objętościach wody posianej).

Spośród prób o wynikach niezgodnych 46,0% stanowiły próby o fermentacji wyższej w temp. 30°\*).

\*) Próby wykazujące fermentację w mniejszych objętościach wody niż w temp. 37°.

T a b e l a III

Porównanie wzrostu bakterii grupy coli na agarze Endo i agarze Teaque-Levina

Ilość posiewów* na agar Endo (37°)		Wzrost na agarze Endo						Ilość posiewów na agar Teaque- Levina (30°)		Wzrost na agarze Teaque-Levina					
		Typowy		Nietyp.		Brak wzrostu				Typowy		Nietyp.		Brak wzrostu	
		L	%	L	%	L	%			L	%	L	%	L	%
257	100	125	48,7	16	6,6	116	44,7	195	100	116	59,5	44	22,6	35	17,9

\* W przypadkach wątpliwych w próbie wstępnej przesiewano z jednej próby wody po 2 lub 3 rozcieńczenia wody. Stąd liczba posiewów na agar Endo i agar Teaque-Levina nie pokrywa się z ogólną liczbą badanych prób wody.

\*\* L — liczba.

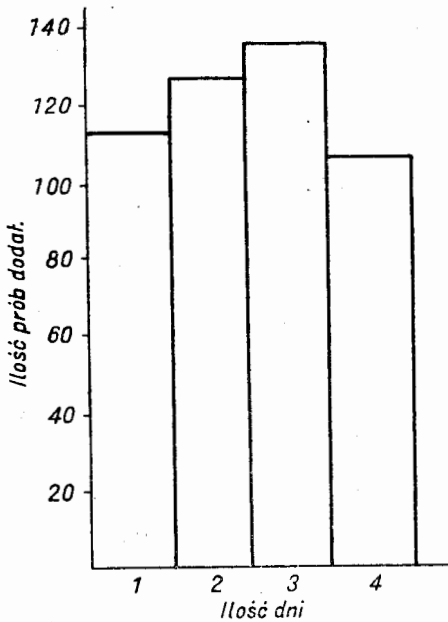
W tabeli III porównano wzrost bakterii grupy coli na agarze Endo i agarze Teaque-Levina. Odsetek płytek wykazujących wzrost typowy dla bakterii grupy coli na agarze Teaque-Levina jest wyższy (59,5%) od analogicznych danych dla agaru Endo (48,7%). Jednakże równocześnie dla agaru Teaque-Levina notowano znacznie wyższy odsetek płytek o wzroście nietypowym (22,6%) — w porównaniu z podłożem Endo (6,6%). W 0,7% przypadków wzrostu nietypowego na agarze Teaque-Levina dalsze badania (testy biochemiczne) wykazały obecność bakterii grupy coli.

T a b e l a IV

Właściwości biochemiczne bakterii grupy coli, hodowanych w temp. 30° i 37°

Rodzaj testu biochemicznego	Ogółem liczba te- stów pro- wadzonych równolegle w temp. 30° i 37°	Wyniki zgodne w temp. 30° i 37°		Wyniki niezgodne w temp. 30° i 37°					
				Ogółem		Dodatnie w temp. 30°		Dodatnie w temp. 37°	
		liczba	%	liczba	%	liczba	%	liczba	%
Wytwarzanie in- dolu	136	95	69,9	41	30,1	12	8,8	29	21,3
Reakcja z czer- wienią metylową	132	90	68,2	42	31,8	37	28,0	5	3,8
Reakcja Voges- Proskauera	132	90	68,2	42	31,8	5	3,8	37	28,0
Reakcja z cytry- nianem na podł. Simmsona	134	94	70,2	40	29,8	27	20,1	13	9,7

Tabela IV zawiera wyniki badań dotyczących właściwości biochemicznych bakterii grupy coli, hodowanych w temp. 30° i 37°. Ogółem stwier-



Ryc. 1. Występowanie dodatniego odczynu z czerwienią metylową, w zależności od ilości dni hodowli na podłożu Fouada w temp. 30°.

hodowli wynosi 96 godz. (Ten sam czas hodowli przewiduje rutynowa metoda stosowana u nas dla reakcji z czerwienią metylową na podłożu Clarka.

Dla reakcji Voges-Proskauera wykonano analogiczne badania, w wyniku których stwierdzono, że wystarczający czas hodowli na podłożu Fouada w temp. 30° wynosi 24 godz. (Oznacza to skrócenie czasu hodowli w porównaniu z podłożem Clarka dla tej samej reakcji o 48 godz.).

#### WNIOSKI

1. Wyższość temp. 30° nad temp. 37°, jako temperatury optymalnej dla hodowli większości bakterii grupy *coli*, została przez nas w części potwierdzona.

2. Zastosowanie podłoża syntetycznego Fouada, w temp. hodowli 30°, pozwala na skrócenie czasu wykonania odczynu Voges-Proskauera z 72 do 24 godz.

3. Metoda MGT szybkiej identyfikacji *E. coli* jest godna polecenia przy rutynowanych badaniach wody pitnej na wsi.

4. Dotychczasowe badania wykazały, że fermentacyjną metodą próbówką polecaną przez *Buttiaux* można uzyskać nie mniej dokładnie niż metodą stosowaną rutynowo w naszym kraju, natomiast wyraźnie skraca czas pracy. Celem potwierdzenia powyższej tezy należałoby przeprowadzić badania na większym materiale, uzupełniając je badaniami kontrolnymi wód naturalnych, sztucznie zakażonych szczepami wzorcowymi.

dzono, że odsetek wyników niezgodnych w porównywanych temperaturach wynosił dla poszczególnych reakcji biochemicznych od 29,8 do 31,8. Ponadto, jak wynika z tabeli, w temp. 30° uzyskano wyższe odsetki dodatnich reakcji z cytrynianem na podłożu Simmons'a. Natomiast w temp. 37° uzyskano więcej wyników dodatnich w reakcji Voges-Proskauera oraz w próbach na wytwarzanie indolu.

W przypadku wyników otrzymanych w reakcji z czerwienią metylową i reakcji Voges-Proskauera nie można pomijać jednakże dodatkowego wpływu (poza temperaturą), jaki miało zastosowanie dwu odmiennych podłoży: podłoża syntetycznego Fouada (30°) i podłoża Clarka (37°).

Wyniki dodatkowych badań nad wyznaczeniem najdogodniejszego czasu hodowli na podłożu Fouada w temp. 30° dla reakcji z czerwienią metylową przedstawia ryc. 1. Jak wynika z wykresu, optymalny czas

Б. Войтковска-Уминьска, Ф. Остапчук

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДВУХ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ  
ФЕРМЕНТАЦИИ В ПРОБИРКАХ ДЛЯ ОБНАРУЖИВАНИЯ БАКТЕРИИ  
ГРУППЫ COLI В КОЛОДЕЗНОЙ ВОДЕ

Содержание

Целью этого труда было сравнить результаты полученные при параллельных определениях методом ферментации в пробирках употребляемых в Польше и методом проф. Buttiaux при исследовании колодезной воды для питья в деревнях при обнаружении бактерии группы coli.

В общем проделано 189 проб колодезной воды из деревенских территорий. Исследования велись параллельно при помощи двух выше упомянутых методов.

Констатировано пригодность пробы Mackenzia и др. при скорой идентификации E.coli в условиях исследования колодезных вод.

Кроме того констатировано, что ферментационный метод поручаемый Buttiaux дает результаты не менее точные нежели рутинный метод применяемый в Польше, но позволяет на уменьшение потери времени.

R. Wojtkowska-Umińska, F. Ostapczuk

COMPARATIVE STUDIES ON TWO METHODES FOR B. COLI  
DETECTION IN PUMP-WATER, BOTH BASED ON GLASS TUBE FERMENTATION  
TECHNIQUE

Summary

189 samples of pump-water from rural areas were analyzed for B. coli with the use of routine glass tube fermentation method and paralelly with the method advised by Buttiaux.

As the result of the study, the suitability of Mackenzie's test for quick detection of E. coli in drinking water in rural areas was confirmed. The method advised by Buttiaux was found to give in much shorter time as good the results as gives the routine method used now in this country.

PIŚMIENICTWO

1. Standard methods for the examination of water, sewage and industrial wates, New York, 1955. — 2. Buttiaux R.: Rev. Hgy. et Méd. Soc., 6, 2, 1958. — 3. Buttiaux R.: L'analyse bactériologique des eaux de consommation, Edit, Med. Flammarion, Paris 1951. — 4. Med. Dośw. Społ., 12, 275, 1930. — 5. Państwowy Zakład Higieny: Ujednostajnione metody bakteriologicznego badania wody, Warszawa 1934 (II wyd. 1945). — 6. Przesmycki F.: Zarys bakteriologii praktycznej, PZWL, Warszawa 1951. — 7. Buttiaux R., Muchemble G., Leurs T.: Ann. Inst. Pasteur, 6, 84, Paris 1953. — 8. Buttiaux R., Smaille J., Pierens Y.: Ann. Inst. Pasteur, 8137 Lille 1956. — 9. Buczowska Z.: Roczn. PZH, 3, 185, 1955.