

BOŻENA KROGULSKA, RENATA SZLACHTA

## DOBÓR PODŁOŻY DO WYKRYWANIA PACIORKOWCÓW KAŁOWYCH W BADANIACH RUTYNOWYCH WODY

### CHOICE OF MEDIA FOR DETECTION OF *STREPTOCOCCUS FAECALIS* IN ROUTINE WATER TESTING

Zakład Higieny Komunalnej, Państwowy Zakład Higieny  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24  
Kierownik: doc. dr hab. S. Maziarka

*Porównano selektywność wybranych podłoży do wykrywania paciorkowców kałowych metodą filtrów membranowych w naturalnej wodzie studziennej. Uznano, że najbardziej przydatne do tych celów jest podłoże agarowe wg Slanetza-Bartley'a i K-F streptococcus wg Kennera. W każdym przypadku powinny być wykonane badania potwierdzające.*

Termin paciorkowce kałowe (*faecal streptococci*) obejmuje paciorkowce izolowane z kału ludzi i zwierząt, należące do serologicznej grupy *Lancefield D*. W obrębie tej grupy wyróżniono dwa rodzaje: *Enterococcus* i *Streptococcus* [4, 12]. Do rodzaju *Enterococcus* zaliczono wszystkie paciorkowce wykazujące zdolność wzrostu w temperaturze 45°C, na podłożu z 40% solami żółci i podłożu z azydkiem sodu w stężeniu hamującym wzrost wielu innych rodzajów bakterii. Cechą charakterystyczną rodzaju *Enterococcus* jest duża tolerancja wobec niekorzystnych warunków wzrostu w obecności 6,5% NaCl przy pH 9,6 w temperaturze 10°C [1]. Do rodzaju *Enterococcus* należą następujące gatunki: *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. Cecorum*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. hiraе*, *E. mundtii* i *E. solitarius*. Większość wymienionych gatunków izolowano z kału człowieka i zwierząt, choć niektóre wyodrębniono również z materiału roślinnego np. *E. faecalis*, *E. maladoratus*, *E. solitarius* [1, 14]. Paciorkowce z rodzaju *Streptococcus* wykazują podobne właściwości jak z rodzaju *Enterococcus*, ale są głównie izolowane z kału zwierząt. Wyróżniono tu dwa gatunki: *S. bovis* i *S. equinus* [1, 14].

Paciorkowce kałowe, podobnie jak bakterie grupy coli są wskaźnikiem kałowego zanieczyszczenia wody [2, 3, 9, 13]. Paciorkowce w porównaniu z bakteriami grupy coli charakteryzują się dłuższą przeżywalnością w wodzie [8, 10] oraz większą odpornością na działanie środków do dezynfekcji wody [8, 12]. Mogą być zatem wskaźnikiem kontroli skuteczności jej dezynfekcji. W przygotowanej nowelizacji Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej, dotyczącej warunków jakim powinna odpowiadać woda do picia i na potrzeby gospodarcze, przewidziano konieczność badania wody dezynfekowanej podawanej do sieci, również w kierunku wykrywania paciorkowców kałowych. Z tego też względu podjęto badania nad wytypowaniem podłoża, które

można by było zaproponować laboratoriom wodociągowym i służbom sanitarnym do badań rutynowych wody w kierunku wykrywania paciorkowców kałowych. Polska Norma [11] i Wydawnictwa Metodyczne PZH [15] polecają podłoże *Slanetza-Bartley'a* przygotowane bezpośrednio w laboratorium. Podłoże to porównano z gotowymi suchymi podłożami firmy *Merck*: Membrane-filter enterococcus agar i Membrane-filter enterococcus agar base, których skład oparty jest na podłożu *Slanetza-Bartley'a* oraz z podłożem zalecanym w międzynarodowej normie ISO [5] KF-streptococcus agar (wg *Kennera*). Ponadto zastosowano jednorazowe płytki z krążkami bibułowymi nasyconymi podłożem o nazwie handlowej „Azid” firmy *Sartorius*.

### MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ

Do wykrywania paciorkowców kałowych zastosowano metodę filtrów membranowych. Przebadano wodę z 50 studni przydomowych, okolic Warszawy. Wybierano studnie o złym stanie technicznym, przeważnie odkryte, często już nieużywane. Z każdej studni sączono po 2 próbki o objętości 10 ml i 2 próbki o objętości 100 ml. Filtry umieszczano na testowanych podłożach i inkubowano w temp. 37°C przez 48 godzin. W badaniach zastosowano następujące podłoża:

1. *Slanetza-Bartley'a*, przygotowane w laboratorium wg metodyki PZH [15] o składzie (w g/l): pepton tryptose -20,0; ekstrakt drożdżowy -5,0;  $K_2HPO_4$  -4,0; glukoza -2,0; agar -10,0; azydek sodu -0,4 (2% roztwór wodny 20 ml); chlorek 2,3,5 - trójfenylo-tetrazolu (TTC, 1% roztwór wodny -10 ml).

2. Membrane-filter enterococcus agar – podłoże suche, gotowe firmy *Merck*.

3. Membrane-filter enterococcus agar base – podłoże suche, gotowe firmy *Merck*.

Skład podłoży 2. i 3. jest identyczny ze składem podłoża *Slanetza-Bartley'a* z tą różnicą, że pepton tryptose zastąpiono peptonem kazeinowym (15,0 g) oraz peptonem z mąki sojowej (5,0 g). Ponadto podłoże 2. zawiera TTC, natomiast do podłoża 3. należy dodać oddzielnie przygotowany 1% roztwór wodny TTC.

4. KF streptococcus agar – podłoże suche gotowe, firmy *Merck* o składzie (w g/l): pepton proteose -10,0; wyciąg drożdżowy 10,0; NaCl -5,0; glicerofosforan sodu -10,0; maltoza -20,0; laktoza -1,0; azydek sodu -0,4; purpura bromokrezolowa -0,015; agar -15,0. Do podłoża po sterylizacji należy dodać 10 ml 1% roztworu wodnego TTC.

5. Azid – firmy *Sartorius*. Skład podłoża wg *Slanetza-Bartley'a*. Podłoże suche, którym wysycone są krążki bibułowe, umieszczone w jednorazowych płytkach z tworzywa sztucznego. Przed położeniem filtru membranowego z przesączoną próbką, krążki należy nasączyć jałową wodą destylowaną (3,0 – 3,5 ml).

Badania potwierdzające. Z każdej płytki z testowanymi podłożami wybiórczo-różnicującymi, zależnie od liczby wyrosłych kolonii, przeszczepiano do badań potwierdzających od 1 do 5 kolonii na skosy agarowe. Badania potwierdzające obejmowały test na wytwarzanie katalazy, wzrost na podłożu płynnym *Litsky'ego* z azydkiem sodu i fioletem etylowym [15] oraz wzrost na podłożu agarowym z azydkiem sodu, eskuliną i solami żółci [5, 7].

### WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Spośród 50-ciu przebadanych próbek wody studziennej tylko w jednej nie wykryto paciorkowców kałowych, natomiast w trzech liczba paciorkowców przewyższała wartość 96 w 10 ml – próby te zostały odrzucone. Kolonie paciorkowców kałowych rosnące na testowanych podłożach charakteryzowały się zabarwieniem różowym do ceglasto-brunatnego, były gładkie lekko wypukłe o średnicy 0,5 mm do 3 mm. Badaniom potwierdzającym poddano 609 kolonii bakterii o wzroście charakterystycznym dla paciorkowców kałowych. Wyniki badań potwierdzających przedstawiono w tabeli I.

Tabela I. Wyniki badań potwierdzających, bakterii wyizolowanych z testowanych podłoży do wykrywania paciorkowców kałowych w wodzie.  
Results of tests confirming the presence of bacteria isolated from tested media for the detection of *Str. faecalis* in water

Liczba kolonii (% kolonii)	PODŁOŻA				
	1	2	3	4	5
Wyizolowanych do potwierdzeń	134	99	103	169	104
Katalazo-ujemnych (-)	111(82,8)	85(85,9)	92(89,3)	169(100)	8(7,7)
Katalazo (-) wzrost dodatni na podłożu <i>Litzkiego</i>	106(95,5)	83(97,6)	88(95,6)	163(96,4)	1(12,5)
Katalazo (-) wzrost dodatni na podłożu z solami żółci	88(79,3)	72(84,7)	83(90,2)	138(81,7)	3(37,5)
Katalazo (-) wzrost dodatni na obu podłożach potwierdzających	84(75,7)	70(82,4)	79(85,9)	132(78,1)	19(12,5)
Katalazo (-) wzrost ujemny na obu podłożach potwierdzających	1(0,9)	0	0	0	5(62,5)

1. *Slanetz-Bartley* PZH; 2. M-F enterococcus agar *Merck*; 3. M-F enterococcus agar base *Mercka*; 4. K-F streptococcus agar base *Mercka*; 5. Azid-Nutrient Pads Sartorius.

Ponieważ paciorkowce kałowe w odróżnieniu od gronkowców są katalazo ujemne, najszybszym testem na podstawie którego można odrzucić, wyrosłe na podłożach wybiórczo-roznicujących kolonie bakterii nie będące paciorkowcami kałowymi, jest test na wytwarzanie katalazy. Jak wynika z danych zawartych w tabeli I jedynym podłożem, z którego wszystkie wyizolowane do badań potwierdzających szczepy nie wytwarzały katalazy, było podłoże K-F streptococcus agar wg *Kennera*. Procent kolonii katalazo-ujemnych wyizolowanych z trzech podłoży agarowych opartych na składzie podłoża *Slanetz-Bartley'a* był zbliżony i wynosił średnio 86%. Najmniej wybiórczym okazało się podłoże Azid, na krążkach bibułowych. Na podłożu tym aż 94,3% kolonii o wyglądzie charakterystycznym dla paciorkowców kałowych, wykazywało zdolność wytwarzania katalazy, co wykluczało ich przynależność do paciorkowców kałowych. Uzyskany wynik jest zaskakujący, gdyż podłoże to (wg deklaracji producenta) jest również oparte na składzie *Slanetz-Bartley'a*. Prawdopodobnie podczas wysycania krążków bibułowych składnikami podłoża, w trakcie ich produkcji, następuje proces suchej sterylizacji, co powoduje rozkład termowrażliwego TTC, będącego obok azydku sodu podstawowym składnikiem hamującym wzrost mikroflory towarzyszącej paciorkowcom kałowym. Według metodyki PZH [15] zarówno roztwory azydku sodu jak i TTC należy przygotować oddzielnie na sterylnej wodzie destylowanej i dodawać do podłoża *Slanetz-Bartley'a* tuż przed rozlaniem podłoża na płytki Petriego. W zastosowanych gotowych podłożach firmy *Merck* azydek sodu wchodzi w ich skład podstawowy natomiast, TTC, za wyjątkiem podłoża nr 2, należy dodawać oddzielnie w postaci roztworu wodnego. Podłoż opartych na składzie *Slanetz-Bartley'a* firma *Merck* nie zaleca sterylizować w autoklawie lecz jedynie rozpuścić ogrzewając do wrzenia i po 3 minutach schłodzić do temperatury 50°C – 60°C, jest to szczególnie ważne w przypadku podłoża zawierającego

w składzie podstawowym TTC (podłoże nr 2). Również norma ISO [5] nie zaleca sterylizacji w autoklawie podłoży polecanych do izolacji paciorkowców kałowych, zawierających w swoim składzie azydek sodu, a TTC zaleca dodawać zawsze oddzielnie w postaci roztworu wodnego po uprzednim rozpuszczeniu na gorąco wszystkich innych składników.

Metodyka PZH [15], przy badaniach specjalnych lub w przypadku wzrostu kolonii tzw. „wątpliwych”, oprócz testu na wytwarzanie katalazy zaleca m.in. wykonanie badań potwierdzających na podłożu płynnym *Litsky'ego*. Norma ISO [5] natomiast zaleca wykonanie badań potwierdzających na podłożu agarowym z solami żółci i eskuliną, należy je przeprowadzać również w badaniach rutynowych przy charakterystycznym wzroście kolorii na podłożach izolacyjnych. Polska Norma [11] nie przewiduje żadnych badań potwierdzających, badanie rutynowe w kierunku wykrywania paciorkowców kałowych kończy się na policzeniu charakterystycznych kolonii na podłożu *Slanetza-Bartley'a*. Przedstawione w tabeli I wyniki badań wskazują na konieczność wykonania, również w badaniach rutynowych wody, testu na wytwarzanie katalazy oraz posiewu na przynajmniej jedno z podłoży potwierdzających (*Litsky'ego* lub z solami żółci i eskuliną), pozwoli to na wyeliminowanie wyników tzw. fałszywie dodatnich.

Porównanie wyników izolacji na zastosowanych w badaniach podłożach przeprowadzono w oparciu o normę ISO 9998:1991 [6], wykorzystując dwukierunkową analizę wariancji. Ze względu na wyraźnie odbiegające od pozostałych wyniki izolacji paciorkowców kałowych na podłożu Azid (96% wyników fałszywie dodatnich), podłoże to zostało pominięte w przeprowadzonej analizie. Analizie statystycznej poddano 30 próbek wody posiewanych w dwóch powtórzeniach i w dwóch objętościach na cztery podłoża agarowe. Uzyskane wartości zostały zanalizowane przy zastosowaniu tablic rozkładu *F-Snedecora* dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$ , przy założeniu, że podłożem kontrolnym było podłoże *Slanetza-Bartley'a* przygotowane wg metodyki PZH. Odczytana z tablic wartość testu F wynosiła 1,66 i była wyższa od wartości testu F uzyskanych na porównywanych podłożach. Dla podłoża MF-enterococcus agar wartość F wynosiła 1,12, dla podłoża MF-enterococcus agar base 1,51 i dla KF streptococcus agar 1,30. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że między podłożem kontrolnym (*Slanetza-Bartley'a* – PZH) a podłożami gotowymi firmy *Mercka* opartymi na składzie podłoża *Slanetza-Bartley'a* oraz podłożem KF streptococcus agar nie ma istotnych różnic. Podłoża te mogą być stosowane alternatywnie w badaniach rutynowych wody w kierunku wykrywania paciorkowców kałowych.

#### WNIOSKI

1. Badania wykazały brak istotnych różnic między podłożem *Slanetza-Bartley'a* przygotowanym w warunkach laboratoryjnych oraz suchymi, gotowymi podłożami MF-enterococcus agar i KF-streptococcus agar. Podłoża te mogą być stosowane w badaniach rutynowych wody w kierunku wykrywania paciorkowców kałowych.

2. Nie zaleca się stosowania krążków bibułowych wysyconych podłożem Azid, gdyż otrzymuje się wyniki fałszywie dodatnie.

3. W każdym przypadku należy wykonać badania potwierdzające obejmujące test na wytwarzanie katalazy oraz posiew na podłoże płynne *Litsky'ego* lub podłoże agarowe z solami żółci i eskuliną.

B. Krogulska, R. Szlachta

CHOICE OF MEDIA FOR DETECTION OF *STR. FAECALIS* IN ROUTINE WATER TESTING

## Summary

The aim the study was to find a medium for routine water testing for detection of *Streptococcus faecalis* which could be used by water supply laboratories and sanitary services. In the study dry ready *Merck* media were used: MF-enterococcus agar, MF-enterococcus agar base, K-F-streptococcus agar, and Azide Nutrient Pad Sets (of Sartorius). The *Slanetz-Bartley* medium prepared in our laboratory National Institute of Hygiene (PZH). Method served as control. The usefulness of media for the isolation of *Str. faecalis* was tested in waters of household wells in the environs of Warsaw. Water from 50 wells was tested; from each well two samples of 10 ml and 100 ml were filtered. The filters were placed on the tested media and incubated at 37°C for 48 hours. Colonies with characteristic pink or orange brown colour were counted. From each plate 3–5 colonies were taken for verification tests. For verification tests 609 bacterial colonies showing characteristic growth on tested media were taken. For the statistical analysis of the results variance analysis was used which showed no significant differences between the control *Slanetz-Bartley* medium and the ready *Merck* media. These media can be used alternatively for routine water testing for detection of *Str. faecalis*. The Azide medium is not recommended since 96% of colonies showing in this test the growth characteristic of *Str. faecalis* were negative in verification tests. In routine water testing in case of growth of characteristic colonies on isolation media, it is recommended to carry out verification tests including, at least, a test for catalyse production, and culture on *Litsky* liquid medium or agar medium with bile salts and aesculin.

## PIŚMIENICTWO

1. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1986, t.2, – 2. *Charriere G., Mossel D. A. A., Beaudeau P., Leclerc H.*: Assesment of the marker value of various components of the coli-aerogenes group of Enterobacteriaceae and of drinking water supplies, *J. Appl. Bact.*, 1994, 76, 336.
- 3. *Colque C., Devriese J.I., Haesebrouch F.*: Streptococci and enterococci associated with tonsil of cattle. *Lett. Appl. Microb.*, 1993, 16, 72.
- 4. *Hernandez J. F., Pourcher A. M., Delattre J. M., Oger C., Loeuillard J. L.*: MPN Miniaturized procedure for the enumeration of faecal enterococci in fresh and marine waters: the must procedure. *Wat. Res.*, 1993, 4,27, 597.
- 5. ISO 7899/2 Water quality – Detection and enumeration of faecal streptococci – Part 2: method by membrane filtration. First edition 1984.
- 6. ISO 9998 Water quality – Practices for evaluating and controlling microbiological colony count media used in water quality test. First edition 1991.
- 7. *Kenner B. A., Clark H. F., Kabler P. W.*: Fecal streptococci. Cultivation and enumeration of streptococci in surface waters. *Appl. Microbiol.*, 1961, 9, 15.
- 8. *Kjellander J.*: Enteric streptococci as indicators of fecal contamination of water. *Acta Path. Microbiol. Scand. Supl.*, 1960, 48, 136.
- 9. *Maleszewska J. Ziemińska S., Haman S., Mitkowska-Jankowska D.*: Paciorkowce kałowe jako wskaźnik kałowego zanieczyszczenia wody. *Roczn. PZH*, 1980, 31, 2.
- 10. *Maleszewska J., Ziemińska S., Haman S., Mitkowska-Jankowska D.*: Paciorkowce kałowe jako wskaźnik kałowego zanieczyszczenia wody. *Roczn. PZH*, 1980, 31, 5.
11. PN 82 C-04615/25. Woda i ścieki. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie paciorkowców kałowych metodą filtrów membranowych (FM) i metodą próbówkową.
- 12. *Ramadan F. M.*: Comparative studies on the detection of pollution of water, milk and ice cream. *Appl. Microbiol.*, 1960, 8, 199.
- 13. *Ramos-Cormenzano A., Castillo A., Incerti C., Gomez-Palma L. F.*: Bacteriological indicators of faecal contamination results of a loading experiments with untreated urban wastewater. *J. Appl. Bact.*, 1994, 76, 95.
- 14. WHO Guidelines for drinking water quality. Health criteria and other supporting information pathogenic agents. Fourth draft 1992, 2.
- 15. *Ziemińska S., Maleszewska J.*: Metodyka paciorkowców kałowych w wodzie. *Wyd. Met. PZH*, 1980.