

DONIESIENIE

RENATA SZLACHTA, EWA WASILEWSKA¹⁾, BOŻENA KROGULSKA

ZASTOSOWANIE PODŁOŻA CHAPMANA I BAIRD-PARKERA DO IZOLACJI GRONKOWCÓW Z WODY BASENÓW KĄPIELOWYCH

ISOLATION OF *STAPHYLOCOCCI* FROM SWIMMING POOL WATER BY USING CHAPMAN AND BAIRD-PARKER MEDIA

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

¹⁾ Dział Higieny Komunalnej
Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Łodzi
90-040 Łódź, ul. Wodna 40
Dyrektor: J. Balcerak

Gronkowce są Gram dodatnimi bakteriami szeroko rozpowszechnionymi w środowisku człowieka. Wchodzą one w skład naturalnej mikroflory bakteryjnej skóry, błon śluzowych jamy ustnej, nosa i górnych dróg oddechowych. Przyczyną licznych infekcji jest przede wszystkim koagulazo-dodatni gronkowiec złocisty (*Staphylococcus aureus*) [5]. Do rodzaju *Staphylococcus* zalicza się kuliste lub owalne ziarniaki o średnicy komórek 0,5–1,5 μm . Gronkowce łatwo rosną na zwykłych podłożach, wykazują dużą aktywność metaboliczną, rozkładają węglowodany, wytwarzają pigmenty od barwy białej do ciemnożółtej [4]. Są względnie beztlenowcami, które bardzo dobrze rozwijają się w środowisku obojętnym lub słabo zasadowym. Większość szczepów gronkowców rośnie w środowisku zawierającym do 15% NaCl, mogą również rosnąć w obecności 40% żółci. Gronkowce obok bakterii grupy coli typu kałowego są ważnymi wskaźnikami czystości wody w basenach kąpielowych. W Polsce obowiązek wykonywania badań w kierunku wykrywania gronkowców wprowadzono w 1990 roku [7]. Gronkowce wykazują dość dużą oporność na środki dezynfekcyjne. Dla porównania do zabicia w ciągu minuty 99,9% gronkowców przy ich początkowej liczbie 10^5 w 100 ml wody konieczne jest stężenie wolnego chloru wynoszące 1 mg/l podczas gdy do zabicia *Pseudomonas aeruginosa* i paciorkowców zieleniejących wystarcza 0,4 mg/l Cl_2 , a dla *E. coli* tylko 0,3 mg/l Cl_2 [2]. Możliwość przeżywania gronkowców przy stosowanych stężeniach chloru spowodowana jest ochronnym działaniem złuszczonego naskórka, tłuszczu i innych wydzielin gruczołów skórnych, osłabiających penetrację środka dezynfekcyjnego do komórki bakteryjnej [3]. Nie ma ścisłej korelacji pomiędzy występowaniem tych bakterii w wodzie a stosowanymi w basenach kąpielowych stężeniami chloru, istnieje natomiast zależność pomiędzy występowaniem gronkowców a liczbą kąpiących się osób [1]. Stwierdzono, że przestrzeganie zasad higieny osobistej obok higieny otoczenia oraz

prawidłowości przebiegu procesów uzdatniania wody i eksploatacji basenu pozwalają na utrzymanie odpowiedniej jakości wody w basenie.

Do badań na obecność gronkowców w wodzie zaleca się stosowanie podłoża *Chapmana*. Na podłożu tym *Staphylococcus aureus* rośnie w postaci gładkich, wypukłych, złocisto-żółtych kolonii, które odbarwiają podłoże. Większość innych gatunków gronkowców tworzy różowo-białe kolonie nie odbarwiającej podłoża. W badaniach wykrywania gronkowców w produktach żywnościowych stosuje się podłoże *Baird Parkera* [6]. Na podłożu tym typowe kolonie (egg-yolk dodatnie) *Staphylococcus aureus* są gładkie, czarne, otoczone przezroczystą lub opalizującą strefą. Kolonie nietypowe (egg-yolk ujemne) mogą być czarne, szaroczarne, błyszczące z wąską białą obwódką bez przezroczystej strefy albo z mało wyraźną strefą, mogą również występować kolonie szorstkie. Ponieważ gronkowce charakteryzują się dużą zmiennością wzrostu, wyrosłe kolonie zarówno na podłożu *Chapmana* jak i *Baird-Parkera* wymagają przeprowadzenia badań potwierdzających. Minimalny zakres badań potwierdzających jaki jest wymagany w pracy rutynowej to test na wytwarzanie katalazy i koagulazy. Wszystkie gronkowce w badaniu na katalazę dają wynik dodatni, natomiast wynik badań na koagulazę jest dla *S. aureus* dodatni, a dla pozostałych gatunków gronkowców ujemny.

MATERIAŁ I METODYKA

Do badań porównawczych zastosowano podłoże *Chapmana* [8] oraz podłoże *Baird-Parkera* [6] o następującym składzie:

1. Podłoże *Chapmana* – pepton proteozowy 10,0 g, chlorek sodu 75,0 g, mannitol 10,0 g, ekstrakt mięsny wołowy 3,0 g, czerwień fenolowa 12,5 ml (0,2% roztwór w 50% alkoholu etylowego), agar 15,0 g.
2. Podłoże *Baird-Parker* – Pożywka podstawowa: pepton tryptozowy 10,0 g, ekstrakt drożdżowy 1,0 g, ekstrakt mięsny 5,0 g, glicyna 12,0 g, chlorek litu 5,0 g, agar 12–20 g. Pożywka kompletna: pożywka podstawowa 90,0 ml, roztwór tellurynu potasu 1,0 ml, roztwór pirogromianu sodu 5,0 ml, emulsja żółtka jaja 5,0 ml.

Wstępnego porównania wzrostu na tych podłożach dokonano w Pracowni Mikrobiologii Sanitarnej Zakładu Higieny Komunalnej PZH, przy użyciu szczepów *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis* w izolowanych ze środowiska wodnego. Badania prób wody z basenów kąpielowych w kierunku wykrywania gronkowców, zostały przeprowadzone w laboratorium WSSE-Łódź. Odpowiednie rozcieńczenia hodowli czystych szczepów oraz próby wody z basenów kąpielowych posiewano metodą filtrów membranowych. Filtry umieszczano na testowanych podłożach i inkubowano w temperaturze 37°C, wyniki odczytywano po 24 i 48 godzinach. Wyrosłe kolonie potwierdzano testem na katalazę i koagulazę (lub clumping factor).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Badania przeprowadzono w trzech seriach i w pięciu powtórzeniach dla każdej serii. Średnią liczbę kolonii *S. aureus* i *S. epidermidis* wyrosłych na podłożu *Chapmana* i *Baird-Parkera* przedstawiono w tabeli I.

Wzrost kolonii był widoczny po 24 godzinach inkubacji tylko na podłożu *Chapmana*, natomiast na podłożu *Baird-Parkera* wyraźny wzrost obserwowano dopiero po 48 godzinach, przy czym liczba wyrosłych kolonii na podłożu *Baird-Parkera* po 48 godzinach inkubacji była średnio o 27% niższa. Na stosowanych podłożach oba gatunki

Tabela I. Liczba kolonii bakterii szczepów wzorcowych na porównywanych podłożach
Number of colonies of standard strains on the mediums subjected to comparison

Gatunek bakterii	Rozcieńczenie	Podłoże, czas inkubacji w godz.			
		<i>Chapman</i>		<i>Baird-Parker</i>	
		24	48	24	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^{-7} / 1 ml	41	42	0	36
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^{-8} / 1 ml	7	7	0	4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10^{-7} / 1 ml	16	45	0	34

Tabela II. Opis kolonii gronkowców wyrastających na podłożu *Chapmana* i *Baird-Parkera*
Description of *staphylococcus* colony growth on *Chapman* and *Baird-Parker* media

Gatunek bakterii	Podłoże, czas inkubacji w godz.	
	<i>Chapman</i>	<i>Baird-Parker</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	kolonie złocistożółte, odbarwiają podłoże	kolonie czarne z widoczną strefą przejaśnienia wokół kolonii
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	kolonie białoróżowe, nie odbarwiają podłoża	kolonie szarobrunatne bez strefy przejaśnienia

gronkowców wyrastały w postaci charakterystycznych kolonii których opis zawarto w tabeli II.

Ze względu na różnice jakie mogą występować we wzroście szczepów muzealnych i szczepów bezpośrednio izolowanych z prób wody basenowej, gdzie istotne znaczenie ma stosowanie środków dezynfekcyjnych, które mogą wpływać na osłabienie wzrostu bakterii i wytwarzanie pigmentu, dalsze badania były przeprowadzone na próbach wody pobieranych z basenów, podczas rutynowych kontroli jakości wody przez Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w Łodzi. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli III.

Wyniki fałszywie dodatnie wystąpiły w próbach pobranych z basenu Łódź - Bałuty i Łódź Śródmieście. Wyizolowane bakterie były katalazo i koagulazo ujemne. W przypadku wody z basenu Łódź-Bałuty zanotowano 44 wyniki fałszywie dodatnie na podłożu *Chapmana* co stanowiło 6,4% wszystkich wyrosłych kolonii, na podłożu *Baird-Parkera* wyników fałszywie dodatnich było 9, co stanowiło 1,9% wyrosłych na tym podłożu kolonii. Równocześnie w próbach tych, na podłożu *Baird-Parkera*, zanotowano 25 kolonii gronkowców koagulazo dodatnich. Na podłożu *Chapmana* gronkowców koagulazo dodatnich nie wykryto w żadnej z badanych prób. Na obu podłożach bakterie tworzyły dobrze widoczne kolonie. Na podłożu *Baird-Parkera* gronkowce koagulazo dodatnie tworzyły typowe kolonie egg-yolk dodatnie, pozostałe gronkowce koagulazo ujemne rosły w postaci nietypowych kolonii egg-yolk ujemnych.

Dalsze badania wykonywane przez WSE-Łódź były prowadzone na podłożu *Baird-Parkera*. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli IV.

Tabela III. Wyniki badań potwierdzających kolonii bakterii izolowanych z wody basenów kąpielowych, na podłożach *Chapmana* i *Baird-Parkera*
Results of the confirmative studies of the colonies isolated on the *Chapman* and *Baird-Parker* mediums from the swimming pool water

Baseny w nadzorze WSSE-Łódź Podłoże	Łódź-Śródmieście		Centrum Zdrowia Matki Polki		Łódź-Górne		Łódź-Bałuty	
	<i>Chapman</i>	<i>Baird-Parker</i>	<i>Chapman</i>	<i>Baird-Parker</i>	<i>Chapman</i>	<i>Baird-Parker</i>	<i>Chapman</i>	<i>Baird-Parker</i>
Liczba prób	30	30	35	35	72	72	63	63
Testy potwierdzające	Liczba kolonii							
katalazo- i koagulazo+	0	0	0	0	0	0	0	0
katalazo- i koagulazo-	1	0	0	0	0	0	44	9
katalazo+ i koagulazo-	18	16	414	124	205	304	639	425
katalazo+ i koagulazo-	0	0	0	0	0	0	0	25

* zawartość chloru w badanych próbach wahała się od 0.1–0.6 mgCl₂/dm³

Tabela IV. Wyniki badań potwierdzających kolonii bakterii izolowanych z wody basenów kąpielowych, na podłożu *Baird-Parkera*
Results of the confirmative studies of the colonies isolated on the mediums from the swimming pool water

Baseny w nadzorze WSSE-Łódź	Łódź-Bałuty	Centrum Zdrowia Matki Polki
Liczba próbek wody	210	72
Testy potwierdzające	Liczba kolonii	
katalazo- i koagulazo+	0	0
katalazo- i koagulazo-	27	0
katalazo+ i koagulazo-	270	275
katalazo+ i koagulazo-	0	122

Spośród wszystkich 694 kolonii jakie wyrosły na zastosowanym podłożu *Baird-Parkera* 27 kolonii nie potwierdziło się, były to bakterie katalazo ujemne i koagulazo ujemne. Wyniki fałszywie dodatnie stanowiły 3,8%.

WNIOSKI

1. Do badań rutynowych w kierunku izolacji gronkowców z wody alternatywnie może być stosowane podłoże *Chapmana* i *Baird-Parkera*, należy jednak mieć na uwadze to, że kolonie na podłożu *Baird-Parkera* są wyraźnie widoczne dopiero po 48 godzinach izolacji.

2. Kolonie gronkowców wyrosłe zarówno na podłożu *Chapmana* jak i *Baird-Parkera* ze względu na dużą zmienność morfologiczną jak również ze względu na konieczność wykluczenia wyników fałszywie dodatnich wymagają wykonania testów potwierdzających na wytwarzanie katalazy i koagulazy.

PIŚMIENICTWO

1. *Exner M., Havenith N.*: Mikrobiologische Untersuchungen and Kleinwarmwasserbecken und Hot-Whirl-Pools. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B 1981, 173, 250.
2. *Haman S., Miłkowska-Jankowska D.*: Przeżywalność gronkowców oraz bakterii grupy *coli* w chlorowanej wodzie pływalni w doświadczeniach modelowych. Roczn. PZH 1980, 31, 87.
3. *Jentsh F., Böhlck J., Sonntag H. G.*: Zum Vorkommen von Staphylokokken und *Pseudomonas* in Schwimmbeckenwasser. Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B 1980, 170, 469.
4. *Mechanisms of Microbiology Disease*, ed. 2, *Williams and Willkins*, Baltimore Maryland, 1993, 187.
5. *Medical Microbiology*, 3rd ed. by *Samuel Baron*, *Churchill Livingstone*, New York, London, Edinburgh, Melbourne, Tokyo, 1991, 203.
6. PN-93/A-86034/13 Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. *Staphylococcus aureus* (gronkowce chorobotwórcze) – wykrywanie obecności, oznaczanie najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL), oznaczanie liczby metodą płytkową.
7. Rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej w sprawie warunków jakim powinna odpowiadać woda do picia i na potrzeby gospodarcze. Dz. U. nr 35, poz 205 z 1990 r.
8. *Załęska H., Teisseyre T., Janczura E.*: Pożywki bakteriologiczne. Skład i przygotowanie. Wyd. Metod. PZH 1973, 3 (48), 66.

Otrzymano: 1997.11.17