

# Главная тема. Водный контроль: уроки для аналитиков

## Читайте и узнаете:

- об эффективности среды «Блеск» при определении микробиологического показателя безопасности воды и пищевых продуктов синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*;
- от чего зависит феномен проявления блеска на среде «Блеск», и какова диагностическая значимость данного признака;
- какие альтернативные среды можно использовать для определения синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*

## Ключевые слова:

методика, вода, синегнойная палочка, *Pseudomonas aeruginosa*, питательная среда «Блеск»

## Не все то золото, что блестит

**С.Н. Тымчук**

ведущий бактериолог отдела биологических методов анализа ЗАО «РОСА», канд. мед. наук

**Е.Н. Ахапкина**

начальник сектора бактериологии и вирусологии отдела биологических методов анализа ЗАО «РОСА»

**В.Е. Ларин**

начальник отдела биологических методов анализа ЗАО «РОСА», канд. биолог. наук

**Е.В. Буданова**

доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, канд. мед. наук

**Д.Н. Нечаев**

доцент кафедры микробиологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, канд. мед. наук

До сих пор значение санитарного показателя присутствия синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa* в воде устанавливается по методике 80-х гг. прошлого века. Все нормативные документы, регламентирующие обнаружение *P.aeruginosa*

В нормативно-методической базе в области санитарного контроля водных объектов окружающей среды сохраняются неблагоприятные тенденции — вместо создания новых методических документов, учитывающих достижения микробиологии, переиздаются устаревшие методики, а попытки их модификации приводят только к ухудшению чувствительности и специфичности исследования. Примером является ситуация, сложившаяся с нормативными документами, регламентирующими определение синегнойной палочки *Pseudomonas aeruginosa*<sup>1</sup> в различных типах подготовленной воды

в бутилированной воде [1], в минеральной воде и напитках [2], в воде бассейнов [3], предписывают либо использование исходной методики, представленной в методических рекомендациях 1984 г. [4], либо ее «усовершенствованного» варианта, представленного в Приложении 9 «Метод определения *Pseudomonas aeruginosa*» МУ 2.1.4.1184-03 [5]. Учитывая прогресс, произошедший в микробиологии за более чем 30 лет, следует отметить, что методика [4] существенно устарела, прежде всего в том, что касается питательных сред, которые в ней используются.

И исходная методика [4], и ее урезанный вариант [5] в качестве единственной плотной диффе-

ренциальной среды для высева обогащенных суспензий регламентируют среду «Блеск», представляя ее как высокоспецифичную для *P.aeruginosa*. В частности, авторы методики считают видоспецифичным для *P.aeruginosa* признак появления золотистого блеска на поверхности колоний, выросших на этой среде. Более того, «усовершенствованная» методика МУ 2.1.4.1184-03 позволяет в случае отсутствия колоний с золотистым блеском выдавать отрицательный результат.

По своему составу среда «Блеск» (см. справку 2) представляет собой молочный агар с трифенилтетразолием хлоридом (ТТХ), восстановление которого до трифенилформазана придает колони-

<sup>1</sup> Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) — условно-патогенный микроорганизм рода *Pseudomonas* (псевдомонады) (см. справку 1).

ям микроорганизмов, выросших на этой среде, бордовый цвет и в ряде случаев — характерный золотистый блеск. Однако видоспецифичность среды «Блеск» в отношении *Paeruginosa* спорна, так как восстановление ТТХ является признаком активности бактериальных ферментов дегидрогеназ (см. справку 3), которые присущи всем бактериям, а не только *Paeruginosa*, а появление блеска является лишь отражением высокой активности ферментативного восстановления ТТХ и, вероятно, защелачивания среды. На рис. 1 и 2 продемонстрировано наличие золотистого блеска в посевах эталонных культур энтерококка на азидном агаре с ТТХ и сальмонелл на среде Тергитол-7 с ТТХ.

Кроме того, среда «Блеск» является нестандартизованной средой, которая готовится *ex tempore*<sup>2</sup>, и ее эффективность в значительной степени зависит от состава компонентов, что признают и сами разработчики [4].

Целью работы, результаты которой представлены в статье, была проверка специфичности среды «Блеск», а также оценка влияния различных факторов на ее эффективность.

**На первом этапе** исследования оценивали специфичность среды «Блеск» путем параллельного высева эталонных культур *Paeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* M17-02, *Staphylococcus aureus* C2, *Enterococcus faecalis* 489. Посев проводили методом, регламентированным МУ 2.1.4.1184-03. Параллельно оценивали влияние компонентов среды на проявление признака золотистого блеска. В частности, оценивали влияние агаровой основы, которая исполь-

**Рис. 1**  
Золотистый блеск культуры энтерококка при посеве на азидный агар с ТТХ (*Enterococcus* agar, инкубация при 37 °С, 44–48 ч)



**Рис. 2**  
Золотистый блеск культуры сальмонелл на среде Тергитол 7 с ТТХ (верхний посев) (инкубация при 37 °С, 20–24 ч)



## Справка 1

**Псевдомонады (род *Pseudomonas*)** — грамотрицательные палочковидные бактерии с полярно расположенными жгутиками, не образующие спор и растущие в аэробных условиях. Встречаются повсеместно в почве, водоемах, сточных водах и в воздухе.

Микробиология: словарь терминов

Обнаружение *Ps.aeruginosa* в объектах окружающей среды сигнализирует одновременно об эпидемическом (как патоген) и санитарном (как индикатор биологического загрязнения) неблагополучии. Известны острые кишечные инфекции псевдомонадной этиологии водного происхождения и различные формы заболеваний (отиты, поражения кожного покрова) у купающихся в бассейнах, септические заболевания грудных детей с летальным исходом в результате купания в питьевой воде централизованного водоснабжения, содержавшей *Ps.aeruginosa*.

Методические рекомендации 1984 г.

## Справка 2

Для приготовления среды «Блеск» нужно взять: «Мясопептонного стерильного 2 % агара 100,0 мл, молока нормализованного 10,0 мл, 10 % водного раствора трифенилтетразола хлорида 8,0 мл, L-аргинина гидрохлорида 0,3 г, в расплавленный мясopептонный агар прибавить аргинин, р-р трифенилтетразола хлорида (самостерилизуется после хранения при комнатной температуре 2–3 дня) и стерильное снятое молоко размешать, разлить в 6–7 чашек».

Методические рекомендации 1984 г.

<sup>2</sup> Перед использованием — прим. ред.

# Главная тема. Водный контроль: уроки для аналитиков

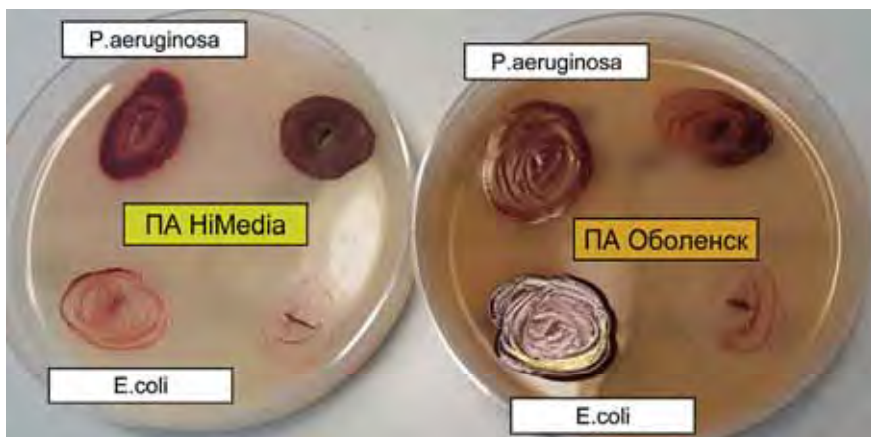
Рис. 3  
Отсутствие видовой специфичности проявления признака золотистого блеска на примере параллельного посева тест-штаммов *P.aeruginosa* и *E.coli* (среда «Блеск», инкубация при 37 °С, 44–48 ч)



Рис. 4  
Отсутствие видовой специфичности проявления признака золотистого блеска на примере параллельного посева тест-штаммов *P.aeruginosa* и *S.aureus* (среда «Блеск», инкубация при 37 °С, 24 ч)



Рис. 5  
Зависимость проявления признака блеска от агаровой основы среды (среда «Блеск», инкубация при 37 °С, 44–48 ч)



## Справка 3

**Дегидрогеназы** — одна из самых многочисленных подгрупп ферментов, катализирующих реакции биологического окисления и восстановления, то есть связанные с процессами дыхания, гликолиза и брожения. Дегидрогеназы обнаружены во всех органах и тканях животных и растений, а также у микроорганизмов. Они катализируют перенос водорода (протонов) от окисляемого субстрата на соединения-акцепторы, которые при этом восстанавливаются. Активность некоторых дегидрогеназ в сыворотке крови служит дополнительным диагностическим тестом при ряде заболеваний.

зуется для приготовления среды, и жирности молока. В качестве агаровой основы использовали коммерческий<sup>5</sup> питательный ГРМ-агар производства ГНЦПМ МЗ РФ (г. Оболенск), и питательный агар производства HiMedia (Индия), как наиболее распространенные на нашем рынке. Молоко использовали марки «Домик в деревне» (Pepsico) жирностью 0,5 и 3,2 %.

На втором этапе исследования оценивали зависимость проявления блеска от количества биомассы целевого микроорганизма, наличия и количества нецелевых микроорганизмов.

Для оценки зависимости степени проявления блеска от количества биомассы *P.aeruginosa* ATCC 9027 проводили высев из суспензий эталонного штамма с диапазоном концентраций от  $10^3$  до  $10^7$  КОЕ/мл на среду «Блеск» наиболее эффективного состава, определенного на первом этапе исследования.

Для оценки зависимости степени проявления блеска от соотношения количества целевых и нецелевых микроорганизмов и роста последних на среду «Блеск» наиболее эффективного состава параллельно высевались суспензии с разными концентрациями нецелевых эталонных культур, одни из которых содержали *P.aeruginosa*, другие нет. Состав и концентрации суспензий представлены в табл. 1.

Исследования показали, что появление золотистого блеска на поверхности макроколоний на среде «Блеск» не имеет видоспецифического характера. Помимо *P.aeruginosa* наблюдалось появление золотистого блеска у макроколоний *E.coli* (рис. 3, 5, 6), а так-

<sup>5</sup> Готовая сухая питательная среда — прим. ред.

же у *S.aureus* (рис. 4, 6). И наоборот — в некоторых вариантах среды «Блеск» *P.aeruginosa* золотистого блеска не образовывала (рис. 5, 6).

Тип агаровой основы и жирность молока имели решающее значение для проявления блеска (рис. 5, 6), который наблюдался в обоих вариантах среды «Блеск», приготовленных на отечественном питательном агаре: с молоком жирностью 3,2 % (рис. 3) и 0,5 % (рис. 4). При использовании питательного агара *HiMedia* признак блеска был выявлен только при добавлении обезжиренного молока (рис. 6).

Следует заметить, что во всех случаях признак блеска не проявил видоспецифичности и наблюдался у микроорганизмов, отличных от *P.aeruginosa*. В связи с этим был сделан вывод о недопустимости выдачи результата только в связи с наличием блестящих колоний на среде «Блеск» без подтверждения пигментообразования, как это допускает МУ 2.1.4.1184-03. Подтверждение способности образовывать пигменты феназинового ряда должно быть обязательным элементом идентификации *P.aeruginosa* [4] и должно выполняться на специализированной среде, а не в простом питательном агаре, как допускает МУ 2.1.4.1184-03.

Результаты опыта по определению признака блеска и оценки зависимости его проявления от количества биомассы целевого микроорганизма в обогащенной суспензии отражены на рис. 7. Появление блеска напрямую зависит от количества биомассы *P.aeruginosa*, и в посевах суспензий с концентрациями эталонной культуры  $10^3$ – $10^4$  КОЕ/мл, когда уже начинали образыва-

Состав модельных суспензий в опыте по определению зависимости наличия признака золотистого блеска от роста посторонних микроорганизмов и соотношения количества целевых и нецелевых микроорганизмов [табл. 1]

Эталонные штаммы в посевах		Концентрации модельных суспензий эталонного штамма (КОЕ/мл)	
Посев 1	Штамм	Суспензия 1	Суспензия 2
	<i>E.coli</i> M17-02	$10^3$	$10^3$
	<i>P.fluorescens</i> 948	$10^3$	$10^3$
	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	—	$10^2$
Посев 2	Штамм	Суспензия 3	Суспензия 4
	<i>E.coli</i> M17-02	$10^5$	$10^5$
	<i>P.fluorescens</i> 948	$10^5$	$10^5$
	<i>P.aeruginosa</i> ATCC9027	—	$10^3$
Посев 3	Штамм	Суспензия 5	Суспензия 6
	<i>E.coli</i> M17-02	$10^7$	$10^7$
	<i>P.fluorescens</i> 948	$10^7$	$10^7$
	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	—	$10^4$
Посев 4	Штамм	Суспензия 5	Суспензия 7
	<i>E.coli</i> M17-02	$10^7$	$10^7$
	<i>P.fluorescens</i> 948	$10^7$	$10^7$
	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	—	$10^7$

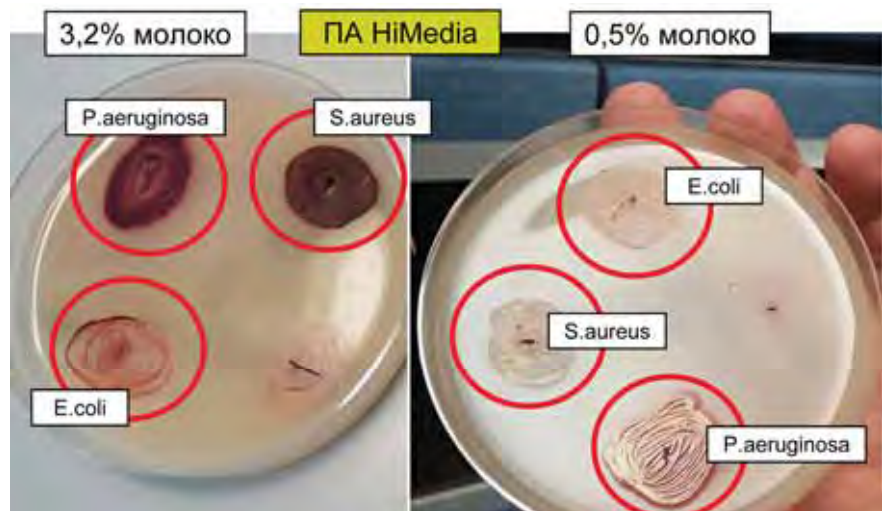
ваться изолированные колонии, блеск отсутствовал. Эта же закономерность прослеживалась и в посеве *E.coli* (рис. 3), изолированные колонии которой не имели блеска, хотя над областью сплошного роста и над колониями, расположенными рядом с ним, блеск присутствовал.

На наш взгляд, феномен проявления блеска связан не только

с активностью бактериальных дегидрогеназ, но и с защелачиванием среды продуктами метаболизма. В пользу этого предположения свидетельствует, например, результат посева эталонных культур на дифференциальную среду с лактозой — Тергитол 7 (рис. 2). Золотистый блеск наблюдался только над штаммом *Salmonella*, который лактозу не утили-

Рис. 6

Зависимость проявления признака блеска от состава молока, которое использовано для приготовления среды (среда «Блеск», инкубация при 37 °С, 44–48 ч)



# Главная тема. Водный контроль: уроки для аналитиков

## Справка 4

«Металлический блеск колоний *Ps. aeruginosa* — явление уникальное, обнаруживаемое, как правило, только у этого микроба, но не у других видов псевдомонад. При принятой концентрации ТТХ среда бактерицидна для всех грамположительных и большинства грамотрицательных бактерий и лишь некоторые ТТХ-резистентные штаммы... могут развиваться на среде «Блеск» в виде темно-красных разного размера, лишенных блеска, или выпуклых блестящих ярко-красных колоний. Колонии *Ps. aeruginosa* либо сплошь покрыты золотистым налетом, либо содержат многочисленные вкрапления, иногда окружены светло-красным ободком или бесцветным «венчиком»».

Методические рекомендации 1984 г.

лизирует, а в качестве источника углерода использует пептон, продукты метаболизма которого защелачивают среду (она синееет).

Таким образом, при недостаточном обогащении пробы, например из-за низких ростовых свойств среды обогащения (среды Бонде), признак блеска не будет проявляться даже при наличии в пробе *P.aeruginosa* из-за недостаточного количества ее биомассы. Поэтому при отсутствии в посевах на среде «Блеск» блестящих колоний следует идентифицировать колонии без блеска, как предписано [4], а не выдавать отрицательный результат, как это регламентирует МУ 2.1.4.1184-03.

Результаты опыта по определению влияния присутствия нецеле-

вой микрофлоры и ее количества на проявление рассматриваемого признака на среде «Блеск» показали, что присутствие в обогащенной пробе посторонних микроорганизмов в концентрациях, равных или превышающих количество *P.aeruginosa*, также блокируют образование блеска. На рис. 8 показан только результат посева суспензий с высокой концентрацией бактерий. Блеск не образуется даже при посеве модельной смеси с содержанием *P.aeruginosa*  $10^7$  КОЕ/мл, хотя при посеве чистой культуры такой концентрации образуется выраженный блеск (рис. 7). Данный феномен не совсем понятен — блеск отсутствует, несмотря на то, что достигнуто значительное количество микробной биомассы. Види-

Рис. 7

Зависимость проявления признака блеска от количества биомассы исследуемой культуры. На рисунке указаны концентрации суспензий, из которых производился высев (среда «Блеск», инкубация при 37 °С, 44–48 ч)



мо, причина — в сочетании модельных штаммов, один из которых в такой комбинации может закислять среду, препятствуя образованию блеска.

Таким образом, при наличии в пробе посторонней микрофлоры блеск может отсутствовать, поэтому, во-первых, посев следует выполнять, как предписано в [4] — макроколонией с последующим рассевом до отдельных колоний для контроля чистоты культуры<sup>4</sup>, а не просто макроколонией, как регламен-

<sup>4</sup> «Высевы следует производить с расчетом получения максимального количества изолированных колоний: минимальное количество посевного материала, захватываемого разогнутой или тщательно стряхнутой петлей, распределяют первоначально в виде макроколонии 1 x 4 см у борта чашки, затем наносят остаток материала частыми многочисленными штрихами по поверхности среды» [4].

Все нормативные документы, регламентирующие обнаружение *Pseudomonas aeruginosa* в бутилированной, минеральной воде, напитках, в воде бассейнов, предписывают использовать либо методику 1984 г., либо ее «урезанный» вариант из МУ 2.1.4.1184-03, хотя они существенно устарели, прежде всего в отношении использования питательных сред

тировано МУ 2.1.4.1184-03. А во-вторых, нужно обязательно подтверждать наличие пигмента, так как этот признак менее чувствителен к присутствию посторонней флоры чем блеск, и пигмент при концентрации *P.aeruginosa* в модельной суспензии  $10^7$  КОЕ/мл и при отсутствии блеска уже заметен как зеленоватый ореол вокруг макроколонии (рис. 8). Зависимость пигментообразования от количества *P.aeruginosa* и наличия посторонней флоры показаны на рис. 9.

**Использованная литература:**

1. СанПиН 2.1.4.1116-02 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества» утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ № 12 от 19.03.2002 г. (ред. от 28.06.2010 г.).
2. СанПиН 2.3.2.1078-01. 2.3.2 «Продовольственное сырье и пищевые продукты. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов» утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ № 36 от 14.11.2001 г. (ред. от 06.07.2011 г.).
3. СанПиН 2.1.2.1188-03. 2.1.2. «Проектирование, строительство и эксплуатация жилых зданий, предприятий коммунально-бытового обслуживания, учреждений образования, культуры, отдыха, спорта. Плавательные бассейны. Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды. Контроль качества» утверждены Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ № 4 от 30.01.2003 г.

**Рис. 8**

Зависимость проявления признака блеска от присутствия и количества биомассы посторонней флоры. На рисунке указаны составы и концентрации эталонных культур в модельных суспензиях, из которых производился высев (среда «Блеск», инкубация при 37 °С, 44–48 ч) (Обозначения: *P.fl.* – *P.fluorescens* 948; *E.C.* – *E.coli* M17-02; *P.a.* – *P.aeruginosa* ATCC 9027.)

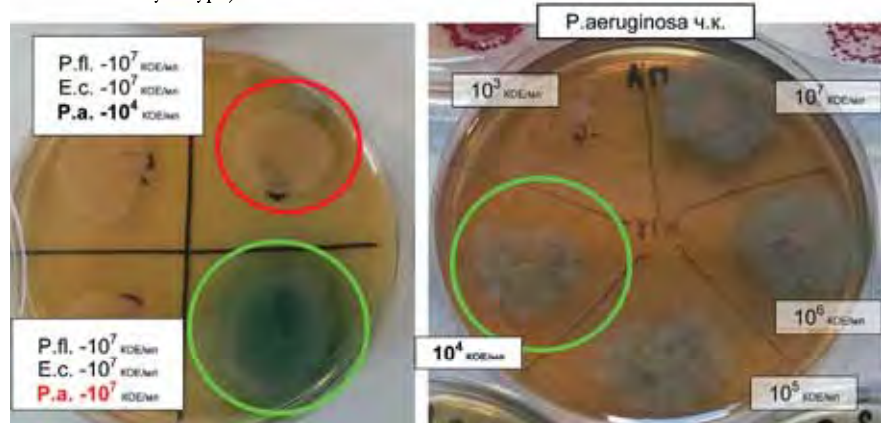


**Справка 5**

**Дифференциально-диагностические среды** — специальные питательные среды, используемые для идентификации микроорганизмов, обладающих избирательной биохимической активностью. В процессе развития микробы с помощью ферментов расщепляют определенные вещества, входящие в состав среды, что устанавливают по ее изменению.

**Рис. 9**

Зависимость пигментообразования от количества биомассы *P.aeruginosa* и присутствия и количества биомассы посторонней флоры. На рисунке указаны составы и концентрации эталонных культур в модельных суспензиях, из которых производился высев (питательный агар, инкубация при 37 °С, 44–48 ч) (Обозначения: *P.fl.* – *P.fluorescens* 948; *E.C.* – *E.coli* M17-02; *P.a.* – *P.aeruginosa* ATCC 9027, ч.к. – чистая культура)



# Главная тема. Водный контроль: уроки для аналитиков

4. Методические рекомендации «Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях)», утверждены Минздравом СССР 24.05.1984 г.

5. МУ 2.1.4.1184-03 «Методические указания по внедрению и применению санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.4.1116-022 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости.

Контроль качества» утвержден Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 15.01.2003 г.

Приложение 9 «Метод определения *Pseudomonas aeruginosa*»



## Резюме

Подводя итоги оценки специфичности среды «Блеск» и эффективности ее использования, можно отметить следующее:

1. Среда «Блеск» не обладает исключительной видоспецифичностью в отношении *P. aeruginosa*.
2. Наличие или отсутствие золотистого отлива колоний на среде «Блеск» зависит от состава агаровой основы, жирности молока, срока инкубации, количества биомассы *P.aeruginosa* и количества посторонней флоры. Наличие блеска определяется метаболической активностью микроорганизмов в данных конкретных условиях среды, а не их видовой принадлежностью.
3. Среду «Блеск» нужно рассматривать как селективную среду с хлоридом трифенилтетразола, подавляющую рост грамположительной микрофлоры, но не как дифференциально-диагностическую (см. справки 4 и 5).
4. Из-за того, что состав среды «Блеск» не стандартизован и ее дифференцирующие свойства в отношении *P.aeruginosa* сомнительны, то для определения данного показателя предпочтительно использовать современные сухие стандартизованные коммерческие среды, например цетримидный агар<sup>1</sup> и/или среду Эндо<sup>2</sup>.
5. Изменения, которые были внесены в методику 1984 г. при подготовке МУ 2.1.4.1184-03, из-за нестабильности присутствия признака блеска на среде «Блеск» могут приводить к получению как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов при исследованиях *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях).

<sup>1</sup> Цетримидный агар — селективная среда для выделения *Pseudomonas aeruginosa* из гноя, мокроты, сточных вод и др.

<sup>2</sup> Среда Эндо — дифференциально-диагностическая питательная среда, предназначенная для выделения энтеробактерий.

## Читайте в ближайших номерах

О тенденциях развития отечественной нормативно-методической базы на примере сравнения эффективности методик определения условно-патогенного микроорганизма рода *Pseudomonas aeruginosa* в воде