

JAN GAŁUSZKA

## W sprawie przydatności bulionu z TTC do oznaczania miana pałeczek z grupy okrężnicy w próbach mleka\*)

Z Wojewódzkiego Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Katowicach  
Kierownik: prof. dr JERZY SZAFIARSKI

Sole tetrazolu, szczególnie chlorek 2, 3, 5 — trójfenylotetrazolu (TTC) znalazły szerokie zastosowanie praktyczne w różnych gałęziach nauk biologicznych i pokrewnych. Zagadnienie to obszernie przedstawił *Anczykowski* (1).

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że poszczególne gatunki i odmiany drobnoustrojów różnią się znacznie stopniem wrażliwości w stosunku do TTC (*Huddlesor*, *Schönberg* i *Kraus*, *Thibaut* i *Welsch*, *Demerlenne* — *Jaminon* i *Thibaut* — cyt. 8). Okazało się, że wszystkie przebadane drobnoustroje są w stanie zredukować TTC do formazonu pod warunkiem, że dodatek TTC zastosowany będzie w stężeniu nietoksycznym i że chodzi w tym wypadku o redukcję niespecyficzną związaną z komórką (23). Chlorek trójfenylotetrazolu hamuje wzrost większości drobnoustrojów gram-dodatnich. Z badań *Gillissena* i *Bechera* (8) wynika np., że gronkowce białe redukują TTC do formazonu jedynie w wysokich stężeniach w obecności glukozy — natomiast gronkowce złociste są zdolne do redukcji TTC nawet w środowisku pozbawionym glukozy.

Sole tetrazolu mimo różnych opinii są często zastosowane w bakteriologii. Między innymi *Bendsen* (3), *Wood* (22), *Sykes* (19) i *Anczykowski* (cyt. 1) zastosowali je do barwienia antygenów brucelozowych, *Barnes* (2) do odróżnienia *Streptococcus faecalis* od *Streptococcus faecium*, a *Laxminarayana* i *Iya* (10) potwierdzili różnicę w zdolności redukcji soli tetrazolowych w obrębie niektórych szczepów paciorkowców kałowych. *Maleszewski* (11) zastosował w badaniach mikrobiologicznych produktów żywnościowych zmodyfikowane podłoże wg *Slanetz*a i *Bartley*a z TTC i azydkiem sodu porównując uzyskane wyniki z mianami na podłożu z fioletem krystalicznym i purpurą bromokrezolową. Uzyskane przy pomocy podłoża z TTC wyniki oceniono jako zadowalające. Zaletami pożywki z TTC była możliwość skrócenia czasu badania do 24 godz., orientacyjna możliwość określania na podstawie stopnia redukcji ilościowego zakażenia żywności przez *Streptococcus faecalis*, *zymogenes* i *liquefaciens* oraz fakt uzyskania wyższych mian w badaniach ilościowych niż na podłożu płynnym z fioletem krystalicznym i purpurą bromokrezolową. *Maleszewski* i *Burzyńska* (12) posługiwali się stałym podłożem z TTC i azydkiem sodu wg modyfikacji *Maleszewskiego* (11) do określania liczby enterokoków w sałatkach garmazeryjnych. Dość częste zastosowanie znalazł TTC w diagnostyce drobnoustrojów z grupy pałeczek okrężnicy (4, 5, 6, 16), a szczególnie przy określaniu tzw. miana coli w mleku i przetworach mleczarskich (7, 13, 17, 18, 20).

Słusznie podkreśla *Anczykowski* (1), że zastosowanie soli tetrazolu posiada jak każda zresztą metoda biologiczna określone wady ograniczające zakres jej zastosowania. Wszelkie prace wykonywane przy pomocy TTC cechować powinna niezwykła skrupulatność i ostrożność. W ocenie wyników szczególnie należy położyć na uwzględnienie ilości drobnoustrojów, ich właściwości fizjologicznych połączonych z różnymi zdolnościami redukcyjnymi, stężenie TTC, temperaturę, czas trwania wylegania a zwłaszcza pH środowiska (8, 14, 15). Zdaniem

*Maleszewskiego* (11) już sama zmiana barwy odczynnika z kremowej na żółtopomarańczową jest momentem dyskwalifikującym.

Zastanawiając się nad zagadnieniem oznaczania miana coli w mleku i przetworach mleczarskich niezależnie od stosowanego podłoża należy podkreślić trudności standaryzacyjnie wynikające z niejednołitego sprecyzowania pojęcia „pałeczek z grupy okrężnicy” (*Coliform, coliforme Keime*). Zgodnie np. z amerykańskimi metodami standardowymi do grupy tej zalicza się wszystkie drobnoustroje gram-ujemne, tlenowe i względnie beztlenowe, nie zarodnikujące, fermentujące laktozę z wytwarzaniem gazu. Wg nomenklatury angielskiej drobnoustroje z grupy pał. okrężnicy fermentują laktozę i dekstrozę z wytwarzaniem kwasu i gazu, przy czym różni się: coli (2 typy), *intermedius* (2 typy), *aerogenes* i *cloacae* (3 typy) i nieregularne (8 typów) — natomiast normy francuskie zaliczają do tej grupy rodzaje *Escherichia*, *Aerobacter* i *Paracolibaculum* (cyt. 18). *Seelemann* i *Wegener* (16) proponują rozszerzenie pojęcia pałeczek z grupy okrężnicy zwłaszcza przy badaniu mleka na pozostałe bakterie gram-ujemne nie pożądane w mleku, szczególnie fluoryzujące i alkalizujące. Propozycja ta posiada pewne uzasadnienie i zasługuje na uwagę. Również poglądy na przydatność różnych podłoży stosowanych dla oznaczania miana coli w mleku i przetworach mlecznych dalekie są od zgodności. Obok podłoża *Kesslera* — *Swenartona* z fioletem genjany stosuje się podłoże z zielenią brylantową, mannitolem, solą sodową kwasu rybinolowego i inne. Przeprowadzone badania wykazały, że dodatek żółci przewidziany w recepturze podłoża *Kesslera* — *Swenartona* lub soli żółciowych nie jest obojętny dla wzrostu bakterii z grupy pał. okrężnicy (*Allan*, *Pasley* i *Pierca*, *Burman*, *Oliver*, *Hendriksen*, *Murray Olsen* — cyt. 4) w związku z czym niektórzy badacze zalecają podłoże z dodatkiem kwasu bornego, kwasu glutaminowego, siarczanu laurylu lub chlorku trójfenylotetrazolu. Normy polskie przewidują zastosowanie dla oznaczania miana coli w próbach mleka podłoża *Kesslera* — *Swenartona*, natomiast w przypadku lodów — pożywki z TTC (13). W obydwu wypadkach obowiązują kontrole na podłożu *Endo*. *Schönberg* (17) wykazał na podstawie wyników badań porównawczych selektywność bulionu z TTC i jego przydatność do badań jakościowych bakterii z grupy pałeczki okrężnicy, przy skróconym czasie inkubacji posiewu pierwotnego. Podobne wyniki uzyskano w badaniach własnych przeprowadzonych w oparciu o metodykę *Schönberga* na próbach mleka pasteryzowanego (7). *Schönherr* (18) w swoim nowoczesnym podręczniku poświęconym metodom standardowym lekarsko-weterynaryjnego badania mleka zaleca obok podłoża *Kesslera* — *Swenartona* do oznaczania bakterii z grupy okrężnicy bulion TTC wg *Schönberga* oraz podłoże syntetyczne *Rubrognost* — TTC „Heyl”, produkowane na skalę techniczną przez jedną z firm niemieckich w zastosowaniu do oznaczania miana coli w mleku w rozumieniu *Seelemanna* i *Wegenera* (16). Pozytywnie wypowiada się o bulionie TTC *Szczepuła* (20) w zastosowaniu do oznaczania miana coli w lodach. Autorka przebadła porównawczo próby lodów pasteryzowanych przy pomocy pożywki wg *Kesslera* — *Swenartona*, podłoża z trypaflawiną i bulionu TTC wykazując przydatność tego ostatniego. Nie stwierdzono przypadku, aby dodatni wynik miana coli na

\*) W dyskusji do artykułu W. Glińskiego: Sprawdzenie przydatności bulionu z TTC (chlorkiem 2, 3, 5, — trójfenylotetrazolu) do określania miana pałeczki okrężnicy w próbkach mleka. *Med. Wet.* 3, 151—153, 1962.

pożywce Kesslera — Swenartona czy pożywce z trypaflawiną nie pokrywał się z wynikiem na bulionie TTC. Wyższość tego ostatniego polega głównie na możliwości skrócenia czasu wylęgania posiewu do 18 godzin.

Inny natomiast pogląd na przydatność bulionu z TTC do oznaczania miana coli w mleku reprezentuje Gliški (9), do którego polemicznego artykułu wkrađło się kilka sformułowań wymagających sprostowania i wyjaśnienia. Prawdą jest, że zastosowanie bulionu z TTC daje znaczne oszczędności czasowe i to jest chyba największa zaleta tego podłoża. Oszczędność ta nie jest jednak tak rewelacyjna, jakby to wynikało ze sformułowania Gliškiego. Pojęcie skrócenia czasu badania w przypadku bulionu z TTC do 18 godzin w porównaniu z 48 godzinami przy podłożu Kesslera — Swenartona odnosi się oczywiście jedynie do czasu wylęgania posiewu pierwotnego a nie całości badania. Uważny czytelnik znajdzie w podanej metodyce (7), że kontrola wzrostu na Endo obowiązuje również w przypadku bulionu z TTC. Trudno zgodzić się z poglądem autora na temat większej przydatności bulionu z TTC do oznaczania miana coli w mleku niepasteryzowanym niż pasteryzowanym. Stwierdzając szczerze, że „redukcja chlorku trójfenyloctetrazolu możliwa jest ze strony całego szeregu innych grup drobnoustrojów, których wzajemny stosunek ilościowy jest dla nas w każdej próbie mleka wielką niewiadomą...” wyciąga zaskakujący wniosek, że „bardziej wierne i zgodne wyniki uzyskuje się w przypadku zastosowania bulionu z chlorkiem trójfenyloctetrazolu do oznaczania miana pałeczki okrężnicy w mleku niepasteryzowanym”. Rozumowanie to jest niesłuszne, albowiem właśnie do badania mleka i przetworów mleczarskich pasteryzowanych, gdzie ogólna ilość drobnoustrojów jest stosunkowo niska, a więc wpływ flory towarzyszącej na wynik dodatni jest względnie mały zastosowanie bulionu z TTC wydaje się bardziej uzasadnione. W przypadku badania mleka moment ten podkreśla między innymi Schönher (18), a lodów Szczepuła (20). Zastrzeżenia budzi również zniekształcony sens wypowiedzi Schönhera (cyt. 21) podczas II Sympozjum Międzynarodowego Towarzystwa Weterynaryjnego Higienistów Środków Spożywczych w Bazylei. Łatwo sprawdzić, że w referowanej przez Trawińskiego wypowiedzi Schönhera na temat podłoża Kesslera — Swenartona chodzi jedynie o wykrywanie pałeczek okrężnicy w mleku surowym, co jest zgodne z poglądami znakomitej większości badaczy na tę sprawę. Sformułowanie „najlepszą pożywkę do wykrywania pałeczek okrężnicy w mleku, a nawet surowym...” wypacza sens tej wypowiedzi sugerując w całokształcie kontekstu, że podłożo Kesslera — Swenartona jest również najlepsze w zastosowaniu do mleka pasteryzowanego co nie wynika z piśmiennictwa, które Gliški cytuje. W tym miejscu wypada podkreślić, że tenże sam Schönher (18) podając opis podłożo do oznaczania miana pał. okrężnicy wyraża nie się zastrzega, że jest sprawą dalszych, obszernych badań doświadczalnych rozstrzygnięcie, które z nich jest najlepsze. Wydaje się, że stanowisko to jest słuszne. Niedostateczne ujęcie całego zagadnienia tak pod względem merytorycznym jak i metodycznym jak również względy ekonomiczne i trudności zaopatrzeniowe przemawiają w chwili obecnej przeciwko wprowadzeniu bulionu z TTC wg Schön-

berga w szerokich, rozpoznawczych badaniach masowych.

#### Piśmiennictwo

1. Anczykowski F.: O przyżyciowym barwieniu komórek i tkanek solami tetrazolu. *Med. Wet.* 9, 588—593, 1959.
2. Barnes E. M.: Tetrazolium reduction as a means of differentiating *Streptococcus faecalis* from *Streptococcus faecium*. *J. Gen. Microbiol.* 14, 57—68, 1956.
3. Bendtsen H.: A new method for staining living bacteria, spermia etc., particularly serviceable for the preparation of brucella ring test antigen. *W.H.O. Brucellosis Information, Ser. 3*, June, 1950.
4. Borneff J.: Methoden und Ziele der Colitestung. *Arch. f. Hyg. u. Bakt.* 141, 505—531, 1957.
5. Borneff J., Frobel B.: Orientierungsteste auf „coliforme“ Keime in Milch und Milchprodukten. *Arch. f. Hyg. u. Bakt.* 141, 241—257, 1957.
6. Chapman G. H.: A culture medium for detecting and confirming *Escherichia coli* in ten hours. *Am. J. Publ. Health and the Nation's Health* 11, 1381, 1951.
7. Gałuszka J.: Bulion z chlorkiem trójfenyloctetrazolu w zastosowaniu do określania miana pałeczek okrężnicy w próbkach mleka. *Med. Wet.* 9, 573—574, 1959.
8. Gillissen G., Becher E.: Die Reduktion von 2, 3, 5-Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) als Methode zur antibakteriellen Wertigkeitsbestimmung. *Arch. f. Hyg. u. Bakt.* 141, 403—420, 1957.
9. Gliški W.: Sprawdzenie przydatności bulionu z TTC (chlorkiem 2, 3, 5, — trójfenyloctetrazolu) do określania miana pałeczki okrężnicy w próbkach mleka. *Med. Wet.* 3, 151—153, 1962.
10. Laxminarayana H., Iya K. K.: Studies on the reduction of tetrazolium by lactic acid bacteria. I. Dve reducing activities of different species. *Indian J. Dairy Sci.* 6, 75, 1953.
11. Maleszewski J.: Stałe podłożo do oznaczania paciorkowców kałowych w produktach żywnościowych. *Roczniki P.Z.H.* 2, 177—186, 1961.
12. Maleszewski J., Burzyńska H.: Ocena mikrobiologiczna sałatek garmazeryjnych. *Roczniki P.Z.H.* 1, 105—111, 1962.
13. Mleko i przetwory mleczarskie. Lody. Pobieranie próbek i metody badań chemicznych i mikrobiologicznych. PN—60/A — 86430, Wydawnictwa Normalizacyjne 16, 1960.
14. Narahara H. T., Quittner H., Goldman L., Antopol W.: The use of neotetrazolium in the study of *Esch. coli* metabolism. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 12, 160—161, 1950.
15. Rust J. B.: Chemical properties of the tetrazolium salts. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* 17, 379—384, 1955.
16. Seelmann M., Wegener K. H.: Zum Nachweis von *Escherichia* — *Aerobacter* — Keimen in Milchprobe. *Milchwiss.* 11, 51—61, 1956.
17. Schönher F.: Zum möglichst effektiven Nachweis coliformer Bakterien in Milch, Wasser und Speiseeis auf TTC — Lactose — Agar. *Arch. f. Hyg. u. Bakt.* 138, 583—585, 1954.
18. Schönher W.: Standardmethoden der tierärztlichen Milchuntersuchung. VEB G. Fischer Verlag, Jena, 1960.
19. Sykes J. A.: Color development in tetrazolium — stained *Brucella abortus* antigens. *Am. J. Hyg.* 63, 288—293, 1956.
20. Szczepuła W.: Zastosowanie podłoża z chlorkiem trójfenyloctetrazolu do oznaczania miana coli w lodach pasteryzowanych. *Roczniki P.Z.H.* 6, 555—558, 1961.
21. Trawiński A.: II Sympozjum Międzynarodowego Towarzystwa Weterynaryjnego Higienistów Środków Spożywczych. *Med. Wet.* 9, 544—546, 1960.
22. Wood R. M.: *Brucella* ring test antigen prepared by reduction of a tetrazolium salt. *Science* 112, 86, 1950.
23. Wundt W.: Untersuchungen über die Reduktionswirkung von Bakterien auf Triphenyltetrazoliumchlorid. *Dtsch. Med. Wschr.* 44, 1471—1472, 1950.

Adres autora: dr Jan Gałuszka, Katowice, ul. Brynowska 27.