

# Vízből kitenyésztett *Streptococcus faecalis* törzsek gyors differenciálása festék-gátlásos módszerrel

HEGEDÜS JÁNOSNÉ

Fővárosi Közegészségügyi Járványügyi Állomás, Budapest

Érkezett: 1972. január 25

A vizekből kitenyésztett *Streptococcus faecalis*-t friss faecalis szennyeződés indikátorának tekintik. Ezért igen fontos e baktérium gyors és biztos alapokon nyugvó identifikálása. Ennek érdekében végeztünk kísérleteket egyes trifenilmetán és azo-festék származékokkal (malachit zöld, kristály ibolya, safranin, bázikus fukszin és janus zöld) és alkalmaztuk ezek antibakteriális hatását vízből kimutatott *Streptococcus faecalis* fajoknak egyéb *Streptococcus* fajoktól való differenciálására. E festékek gátló hatását – az antibiotikum érzékenység vizsgálatának korongos módszeréhez hasonlóan – 158 vízből izolált *Streptococcus* törzsnél vizsgáltuk, párhuzamosan elvégezve e törzsek biokémiai azonosítását is.

## Vizsgálati anyagok és módszerek

Törzsek: részben az OKI törzsközpontjából, részben a Fővárosi Köjál vízbiológiai laboratóriumának rutin anyagából származtak, melyeket a Stanetz-féle M-enterococcus agarról izoláltunk (6).

Módszerek: kísérletünkben két módszert alkalmaztunk párhuzamosan.

### 1. Növekedési és biokémiai reakciók.

60 C°-on 30 percig való túlélés,  
növekedés 6,5%-os NaCl-bouillon-ban,  
növekedés 40%-os epében,  
eszkulin bontás,  
zselatin folyósítás,  
mannit és szorbit erjesztés.

2. Festék-gátlásos módszer. E módszernél a festékkoncentrációk a következők voltak:

- a) 1%-os malachit zöld (Riedel gyártmány)
- b) 0,5%-os kristály ibolya (Chroma gyártmány)
- c) 0,7%-os safranin T (Michroma gyártmány)
- d) 0,3%-os bázikus fukszin (Chroma gyártmány)
- e) 3%-os janus zöld (Reanal gyártmány)

Papír-korongok céljára Whatmann 1 féle szűrőpapírból iratlyukasztó segítségével kimetszett 5 mm átmérőjű, 125 C°on, 30 percig sterilizált korongokat használtunk. Egy korongot a fent említett festékkoldatok 0,005 ml-ével itattunk át. Megfestés után a korongokat szárítószekrényben 45 C°-on 30 percig szárítottuk.

Laboratóriumunkban másfél év folyamán a rutin anyagból származó különböző vizeket 0,45  $\mu$ -os pórusnagyságú membránfilter papíron szűrtük. A szűrőpapírt *Slanetz*-féle M-enterococcus táptalajra helyeztük és 37 C°-os termosztátban 48 óráig inkubáltuk. A membránfilter papíron kinőtt vörös telepeket véresagarra szélesztettük, majd az így kapott tenyésztelt párhuzamosan elvégeztük a biokémiai reakciókat és a festék-gátlásos módszert, melynek kivitele a következő volt. Véresagarról 1 kacsnyi mennyiséget közönséges bouillonba oltottunk és 4 órán át 37 C°-os termosztátban inkubáltuk. A friss bouillon tenyésztet 1 ml-t véresagarra pipettáztuk, a lemezt úgy mozgattuk, hogy a szuszpenzió teljesen elfedje a táptalaj egész felületét. Majd a lemezt kissé oldalt döntve a fölösleg szuszpenziót óvatosan, pipettával leszívtuk. A lemezt száradni hagytuk, majd – az óramutató járásával egyezően – a festékekkel átitatott korongokat a felületére helyeztük. Termosztátban 37 C°-on 24 óráig inkubáltuk, majd ráeső fényben a korongok körül kialakult gátlási gyűrűk átmérőjét mm-rei beosztott vonalzó segítségével lemértük.

1. táblázat

Az OKI törzsközpontjából származó *Streptococcus* típus-törzsek azo- és trifenilmetán festékekkel szemben mutatott érzékenysége

Törzsek megnevezése	Gátlási gyűrűk átmérője mm-ben				
	Malachit z.	Kristály i.	Safarnin.	B. fukszin	Janus z.
80129 – A	19	13	14	12	12
80130 – B	15	15	13	12	12
80133 – C	19	12	11	10	13
80136 – E	20	15	11	12	13
80137 – F	18	12	13	10	12
80138 – G	16	12	13	14	14
80139 – H	17	11	14	10	13
80141 – K	18	12	13	11	13
80142 – L	19	13	13	14	12
80144 – M	20	12	14	13	14
80146 – N	19	18	11	13	13
80149 – Q	17	10	–	7	13
80150 – R	15	11	–	7	13
80171 – D	18	12	–	–	13
80172 – D	17	11	–	–	12
80173 – D	18	14	–	–	13
80174 – D	18	12	–	–	14



## Vizsgálati eredmények

Elsőként a festékgátlásos módszert az OKI törzsközpontjából származó 1–1 A, B, C, E, F, G, H, K, L, M, N, Q, R és D szerocsoportú törzsekkel végeztük el. E típus törzsek festék-gátlási gyűrűinek átmérőit mm-ben kifejezve az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A táblázatban látható, hogy az alkalmazott 5 festék – kisebb nagyobb mértékben – kivétel nélkül gátolta az A, B, C, E, F, G, H, K, L, M, N szerocsoportú törzseket. A Q és R szerocsoportú *Streptococcus* törzsek a safraninnal nem, a bázikus fukszinnal nagyon kicsi gátlási gyűrűt adtak. A D szerocsoportú *Streptococcus* törzsek (*Streptococcus faecalis*, *Str. zymogenes*, *Str. liquefaciens* és *Str. durans*) a safraninnal és a bázikus fukszinnal átítatott korongok körül egyáltalán nem adtak gátlási gyűrűt.

Ezek után vizsgáltuk meg, hogy a festék-gátlásos módszer alkalmazása mennyiben használható a rutin anyagból kimutatott *Streptococcus* törzsek differenciálására. Vizsgálataink során az M-enterococcus agarra helyezett membrán filter papír felületén kinőtt vörös telepekkel elvégeztük a bevezetőben említett biokémiai és növekedési vizsgálatokat. Eredményeinket a 2. táblázat tartalmazza.

A táblázat szerint a különböző vízmintákból származó 158 *Streptococcus* törzs 80%-a bizonyult *Streptococcus faecalis* csoportba tartozó baktériumnak. A differenciálás alapjául a 60 °C-on 30 perces túlélés, eszkulin bontás, növekedés 6,5%-os NaCl-ban, növekedés 40%-os epében szolgált. A zselatin bontás, mannit- és szorbit erjesztés a *Streptococcus* törzseknél variabilis volt (7).

Ugyanezzel a 158 *Streptococcus* törzssel párhuzamosan végeztük el a festékgátlásos módszert, melynél a vizsgált 158 törzs közül 3 festéknél (malachit zöld, kristályibolya és janus zöld) a minták 100%-ában észleltünk gátlási gyűrűt. Két festékkal (safranin, bázikus fukszin) szemben gátlási gyűrűt a vizsgált törzsek 20,2%-ánál találtunk. Eredményeinket az 1. ábra tartalmazza.

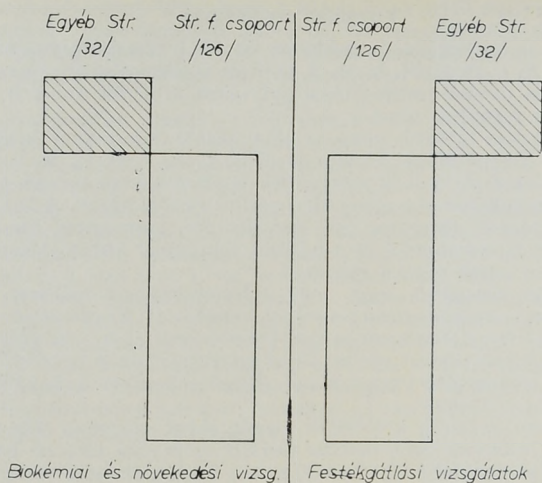
Megjegyezzük, hogy a biokémiai, illetve növekedési vizsgálatokkal a 158 vizsgált törzsből *Streptococcus faecalis* csoportúnak bizonyult 126 törzs, kivétel nélkül úgy viselkedett az 5 festékkal szemben, mint az 1. táblázatban látható D szerocsoportú típus törzsek.

2. táblázat

Vízből izolált *Streptococcus* törzsek biokémiai viselkedése

Biokémiai reakciók, növekedési vizsg.	Vizsgált törzsek száma			
	Összes	+	-	%
60°-on 30' túlélés .....	158	126	32	20,2
Eszkulin-bontás .....	158	126	32	20,2
Növekedés 6,5% NaCl .....	158	126	32	20,2
Növekedés 40% epében .....	158	126	32	20,2
Zselatin-bontás .....	158	83	75	47,4
Mannit-erjesztés .....	158	110	48	30,3
Szorbit-erjesztés .....	158	104	54	34,1

Vizsgálataink során a biokémiai és festék-gátlásos módszerrel talált 20,2% érték (ahogy a 2. táblázatban és az 1. ábrán láttuk) azt mutatja, hogy a *Slanetz*-féle M-enterococcus agarról izolált telepek nem minden esetben bizonyultak *Streptococcus faecalis* csoportba tartozó baktériumnak, hanem más *Streptococcus* típusok, esetleg egyéb coccusok, mint pl. *Aerococcus viridans* törzsek voltak.



1. ábra

A vízminták származása a vizsgált 158 *Streptococcus* törzsnél a következőképpen oszlott meg:

Felszíni víz (Duna és patakok)	= 55 (43,8%)
Fürdőmedencék	= 31 (19,6%)
Kútvizek (ásott, fűrt)	= 21 (13,3%)
Ásvány- és szikvíz	= 14 (8,8%)
Forrásvíz	= 14 (8,8%)
Szennyvíz	= 12 (7,5%)
Klórozott vezetéki víz	= 11 (6,9%)
	158

Megjegyezzük, hogy a vizsgálataink során kiugró 20,2% érték a minták származását tekintve főleg ásvány-, szikvíz és fürdőmedencék mintáiból adódott.

### Megbeszélés

A *Streptococcus*, a *Lactobacillaceae* baktérium család egyik nemzetsége. Fajai általában mindenütt előfordulnak, ahol szénhidrátokat tartalmazó szerves vegyületek találhatóak. *Streptococcus faecalis* csoport emberi és melegvérű állatok bélcsatornájában, székletében rendszerint megtalálható, ezért kimutatása vizekből faecalis szennyeződésre utal (1).

A gyors diagnózis érdekében kísérleteink szerint a *Streptococcus faecalis* csoport biztos identifikálása, a 3 festékekkel szemben mutatott szignifikáns érzékenysége alapján már 1 nap múlva értékelhető, szemben a biokémiai vizsgálata-



okkal, melyek biztonsággal leghamarabb is csak 7 nap múlva értékelhetők Festék-gátlásos módszert eddig *Brucella* típusok elkülönítésére alkalmazták (4, 5). Magyarországon először bélbaktériumok – főleg *Shigellák* – differenciálására alkalmazták ezen festékeket és egyes sókat (8, 9).

Festékek antibakteriális hatásának mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, azonban hatásukért legtöbb esetben a kationokat teszik felelőssé. Eszerint a pozitív töltésű kationok a negatív töltésű mikrobákhoz könnyen kötődnek. A sejtfal nagyobb permeabilitása miatt az érzékenyebb mikrobába a gátló anyag könnyebben jut be és halmozódik fel.\*

\* *Gruickshan* és *Godglück* (2,3) a festődés mechanizmusát genetikai és biokémiai alapon értelmezik.

#### I R O D A L O M

- (1) *Alföldi, Z.*: Orvosi Mikrobiológia, Bp. 1963.
- (2) *Gruickshank, I. C.*: J. Path. Bact. 60, 328, 1948.
- (3) *Godglück, G., Ulbrich, F., Wellmann, G.*: Abl. Bact. 1. Orig. 161, 1954.
- (4) *Huddleson, I. F., Abbell, E.*: I. Inf. Dis. 43, 81, 1928.
- (5) *Huddleson, I. F.*: Am. J. Publ. Health. 21, 491, 1931.
- (6) International Standards for drinking-water. WHO; Geneva. 1971.
- (7) Módszertani útmutató. OKI. Bp. 1969.
- (8) *Serény, B.*: Acta microbiol. Hung. 6, 179, 1959.
- (9) *Serény, B.*: Acta microbiol. Hung. 4, 1, 1961.

### БЫСТРАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ШТАММОВ STREPTOCOCCUS FAECALIS КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ИЗ ВОДЫ МЕТОДОМ ТОРМОЖЕНИЯ КРАСКИ

*Я. Хегедюш*

Автор испытывал селективное антибактериальное влияние малахитовой зелени, кристаллического фиолетового, шафранина, базисного фуксина и и янусовой зелени для дифференциации рас стрептококкуса полученных из воды. Автор установил, что в случае соответствующей концентрации красок размножение штамма Стрептококкус группы серво (в первую очередь *Str. faecalis*, *Str. faecium*, *Str. durans*) шафранин и базисный фуксин не тормозит, а остальные три краски тормозят.

### RASCHE DIFFERENZIERUNG AUS WASSER GEZÜCHTETER STREPTOCOCCUS FAECALIS STÄMME MIT EINER FARBSTOFFHEMMUNGS-METHODE

*J. Hegedüs*

Verfasser untersuchte die selektive antibakterielle Wirkung von Malachitgrün, Kristallviolett, Safranin, basisches Fuchsin und Janusgrün zwecks Differenzierung von im Wasser nachgewiesenen *Streptococcus* Stämmen. Er stellte fest, dass im Falle einer entsprechenden Farbstoffkonzentration die Entwicklung der in Sero-Gruppe D gehörenden Stämme (vor allem *Str. faecalis*, *Str. faecium* und *Str. durans*) von Safranin und basischem Fuchsin nicht, von den anderen drei Farbstoffen jedoch gehemmt wird.

RAPID METHOD FOR DISTINGUISHING STRAINS OF STREPTOCOCCUS  
FAECALIS ISOLATED FROM WATER, BASED ON GROWTH  
INHIBITION BY DYES

J. Hegedűs

The selective antibacterial effect of the dyes malachite green, crystal violet, safranine, basic fuchsin and Janus green was examined in order to check their suitability for distinguishing *Streptococcus* strains isolated from water. It was found that on applying these dyes in appropriate concentrations, safranine and basic fuchsin do not inhibit the growth of *Streptococcus* strains belonging to the D-sero-group (mainly of *Str. faecalis*, *Str. faecium* and *Str. durans*) whereas the other three dyes exhibited strong inhibiting effects.

LA DIFFÉRENTIATION RAPIDE DES SOUCHES DE STREPTOCOCCUS  
FAECALIS ISOLÉES DE L'EAU PAR UNE MÉTHODE D'INHIBITEURS  
À COLORANTS

J. Hegedűs

L'auteur a étudié l'action antibactérienne du vert malachite, du violet cristal, de la safranine, du fuchsin basique et du vert janus afin de distinguer entre les espèces de *Streptococcus* isolées de l'eau. Il a établi qu'en utilisant une concentration appropriée de colorant, la croissance des souches de *Streptococcus* du groupe d'organes D (en premier lieu *Streptococcus faecalis*, *Str. faecium* et *Str. durans*) ne se fait pas inhibiter par la safranine et le fuchsin basique, mais l'inhibition se produit en employant les trois autres colorants.