

614.477[:576.851.48]-078:576.8.01.09-3.4

K VÝZNAMU POUŽITÍ GRAMOVA BARVENÍ PŘI VYŠETŘOVÁNÍ PITNÉ VODY NA COLI-AEROGENES

Prom. biolog Jaromír VEGER

Úvod

U některých popisovaných současných metodik na zjišťování mikrobů skupiny coli-aerogenes v pitných vodách je v našich hygienických učebnicích a publikacích, zabývajících se touto problematikou, uváděno mikroskopické vyšetřování nátěrůvých preparátů, barvených podle Grama, jako součást vyšetřovacího postupu. V těchto případech představuje barvený preparát v průběhu vyšetření buď konečné potvrzující kritérium, nebo při podrobnějším vyšetření tvoří přechod pro následnou biochemickou identifikaci, nebo potvrzující kvasný test.

Popisy metodických postupů vyšetření neuvádějí vždy shodně použití či nepoužití mikroskopického preparátu jako součásti vyšetření. Příkladem toho jsou dále citovaní autoři: Hanuška (3) uvádí použití barveného preparátu jako konečnou zkoušku u metody Savage, Eikman—Bulíř, Parietti a jako pomocné vyšetření u metodik: Ficker—Partiš, membránové filtry, Mucha, standardní sovětská kvasná GOST 5216-50, košická. Naproti tomu Jednotné analytické metody (4) ze 4 uvedených metodik (Savage, Mucha, košická, Ficker—Partiš) uvádějí přímo použití barvení Gramem pouze u metody košické, a to jako konečný důkaz přítomnosti koliformních bakterií. Podobně Symon (10) z popsanych 6 metod (Savage, Mucha, košická, Eikman—Bulíř, Ficker—Partiš, membránové filtry) uvádí výslovně použití Gramova barvení jen u postupu košického, a to opět jako rozhodující konečné kritérium. Autoři Kratochvíl a Zmoray (6) u stejného postupu předepisují po preparátu další iden-

tifikaci zkrácenou biochemickou řadou. Tec (11) uvádí použití mikroskopického vyšetření u membránových filtrů s následujícím potvrzovacím testem. Halačka et al. (2) popisují 6 metodik (Savage, Mucha, Eikman—Bulíř, košická—Kratochvíl a Zmoray, Ficker—Partiš, membránové filtry) a mikroskopické vyšetření je uvedeno pouze u metody košické a Eikman—Bulířovy jako konečný článek vyšetření a u Muchovy metody nátěr z kultury ze šikmého agaru s event. následující biochemickou identifikací.

V naší laboratoři jsme se zaměřili na tento mezičlánek bakteriologického vyšetřování ve snaze zjistit:

1. jak dalece je účelné použití Gramova barvení při vyšetřování pitné vody na mikroby skupiny coli-aerogenes membránovými filtry nebo kvasnými zkouškami,
2. zda se výsledků mikroskopického vyšetření dá použít pro zkrácené vyšetřování,
3. je-li morfologická rozličnost mikrobů v použitelné závislosti na hledaných typech mikrobů ze skupiny coli-aerogenes.

Metodika

Po 18hodinové inkubaci byly jednotlivé zkumavky s glukosovým bujónem u kvasné metody a kolonie, vyrostlé na membránových filtrech, vyočkovány na Endovu půdu. Na 24 hod. kultivované Endově půdě jsme vybírali izolovaně rostoucí podezřelé kolonie pro mikroskopický preparát. Jako podezřelé byly brány v úvahu ko-

lonie tmavě červené s kovovým leskem i bez lesku, červené nebo růžové s tmavým středem, bledě růžové a bezbarvé, o velikosti větší než 1 mm v průměru. Barvení preparátů bylo prováděno Huckerovou modifikací Grama (7). Délkové a šířkové poměry mikrobů jsme zjišťovali na proměřeném mikroskopu při 800násobném zvětšení za použití okulárového mikrometru H 8×. Z těchto kolonií, které byly barveny Gramem, jsme prováděli biochemickou identifikaci pestrou řadou: tvorba indolu, MR test, tvorba acetonu, utilisace citrátu, tvorba plynu a kyseliny u laktosy a glukosy, pohyb, H₂S.

Výsledky mikroskopického odečítání a měření

K zjištění účelnosti odečítání gramnegativních tyček jako takových nám dala odpověď mikroskopická odečítání preparátů u 2000 případů z rutinní praxe. Souhrn výsledků ukázal, že v 99,8 % případů jde o gramnegativní tyčky různých morfologických tvarů. Vysvětlení tohoto faktu spočívá v tom, že i méně zkušený pracovník zpravidla lehce na Endu odečte sporadicky se vyskytující grampozitivní koky a sporulující mikroby. Přitom následná biochemická identifikace ukázala, že gramnegativní tyčky reprezentují nejen mikroby skupiny coli-aerogenes, ale i celou řadu jiných, ve vodě se běžně vyskytujících mikrobů.

Po zjištění těchto skutečností, mluvících pro

svou jednoznačnost v neprospěch pouhého zjišťování gramnegativních tyček, obrátili jsme pozornost na morfologické poměry gramnegativních tyček. Mikroskopické proměřování mělo dát odpověď, zda přes očekávanou variabilitu je nějaká použitelná závislost mezi šířkou a délkou tyček a biochemickými vlastnostmi. Výsledky proměření 500 kmenů, zachycených ve vyšetřovaných vzorcích vody, jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Zjistili jsme, že vyskytující se gramnegativní tyčky je možno zařadit ke 3 šířkovým typům: k silným (střední hodnota 0,7 mí), středním (střední hodnota 0,55 mí) a slabým (střední hodnota 0,4 mí). Protože však šířkové poměry jsou variabilní a při použitím zvětšení neurčitelné s naprostou přesností, je uvedeno v tab. 1 u těchto tří kategorií šířkové rozmezí, jednak aby byly vyloučeny případné nepřesnosti v proměření, jednak pro zjednodušení tabulkového schématu. U délky je použito 4 kategorií. Jsou to 3 kategorie velikostní: až 1,5 mí, až 3 mí, až 4,5 mí a do poslední, 4. kategorie byly řazeny kmeny vykazující tyčkovité řetízky.

V tabulce šířkových poměrů lze pozorovat u *E. coli*, — intermedia, — freundi a *Aerobacter aerogenes* patrný procentní příklon k silnějším tyčkám. *E. coli*, — intermedia, — freundi vykazují nejvyšší početní hodnoty u nejširších tyček, *Aerobacter aerogenes* u střední kategorie. U celé skupiny coli-aerogenes v součtu bylo

	Šířka v mikronech							
	0,3—0,5	0,5—0,6	0,6—0,8	Celkem	0,3—0,5	0,5—0,6	0,6—0,8	Celkem
	absolutní čísla				procenta			
<i>E. coli</i>	2	35	43	80	2,5	43,7	53,7	100
<i>E. intermedia</i> , <i>E. freundi</i>	14	11	25	50	28,0	22,0	50,0	100
<i>Aerobacter aerog.</i>	8	27	15	50	16,0	54,0	30,0	100
Laktosodefektní Esch., Aerob.	11	14	5	30	36,7	46,7	16,6	100
skupina coli-aerogenes	35	87	88	210	16,7	41,4	41,9	100
ostatní mikroby	72	177	41	290	24,8	61,0	14,2	100

Tab. 1. Šířkové poměry v absolutních číslech a procentech

	délka v mikronech									
	až 1,5	až 3	až 4,5	řetízk. vlákna	Celkem	až 1,5	až 3	až 4,5	řetízk. vlákna	Celkem
	absolutní čísla					procenta				
<i>E. coli</i>	7	35	17	21	80	8,7	43,7	21,3	26,3	100
<i>E. intermedia</i> , <i>E. freundi</i>	14	19	5	12	50	28,0	38,0	10,0	24,0	100
<i>Aerobacter aerog.</i>	22	26	1	1	50	44,0	52,0	2,0	2,0	100
Laktosodefektní Esch., Aerob.	8	17	1	4	30	26,6	56,7	3,3	13,4	100
skupina coli-aerogenes	51	97	24	38	210	24,3	46,2	11,4	18,1	100
ostatní mikroby	107	146	6	31	290	36,5	50,5	2,2	10,8	100

Tab. 2. Délkové poměry v absolutních číslech a procentech

83,3 % případů spadajících do rozmezí šířek 0,5—0,8 mí. Naproti tomu většina ostatních ve vodě se vyskytujících mikrobů byla shledána jako tenké, nebo v největším počtu případů jako střední tyčky. Tyto uvedené procentní převahy nejsou však natolik vyhraněné a současně jsou natolik vzájemně shodné s ostatními typy nebo skupinami mikrobů, že nelze s použitelnou pravděpodobností rozlišovat podle šířky nejen typy skupiny coli-aerogenes mezi sebou, ale ani odlišovat celou tuto skupinu od ostatních, ve vodě se vyskytujících mikrobů.

Ze stejných důvodů nepoužitelné výsledky proměření shledáváme v tabulce délkových poměrů. E. coli nalézáme většinou jako delší tyčky s max. délkami 3—4 mí, event. v řetízkových vláknech. Ostatní mikroby vykazují převážně kratší tyčky.

Rovněž kombinace šířky s délkou nedává posilivější výsledky. E. coli nacházíme většinou jako silné delší tyčky, ostatní mikroby jako slabší a kratší tyčky, což ovšem vůbec nevylučuje ostatní kombinace.

Lepších výsledků nebylo dosaženo ani po snaze stabilizovat morfologické vlastnosti na šikmém agaru, nehledě k tomu, že se tím celé vyšetření prodlužuje o další den. Z uvedeného vyplývá, že nelze použít výsledků mikroskopického vyšetření ani po proměření pro zkrácenou identifikaci.

Diskuse

Na základě zjištěných výsledků můžeme při vyšetřování pitné vody na coli-aerogenes v běžné praxi považovat zjišťování gramnegativních tyček v mikroskopických preparátech, zhotovených z kolonií vyrostlých na Endu, za neúčelné a zbytečně zatěžující materiállově i pracovní celou vyšetření. Barvený preparát je možno jako součást vyšetření zcela vynechat bez újmy na výsledku, za předpokladu vcelku snadného správného předchozího odečtení podezřelých kolonií na Endově půdě, které odpovídá výsledkům získaným mikroskopicky.

Popisy metodik, které používají Gramova barvení pro zjišťování gramnegativních tyček a předepisují následnou biochemickou identifikaci, mohou pro jednoznačnost nálezů přejít přímo k identifikaci kolonií z Enda kvasným testem nebo biochemickou řadou, bez mikroskopického vyšetřování. Nadbytečná identifikace u řídkých případů (0,2 %), kdy nejde o gramnegativní tyčky, je výhodnější než příprava a prohlížení mikroskopických preparátů u všech případů. Mikroskopické vyšetření by stačilo provádět výjimečně jen u vysloveně sporných kolonií.

Pokud jde o popisy metodik, používajících mikroskopického preparátu jako konečného kritéria, nutno podotknout, že zde dochází k velké řadě nepřesných závěrů, jak ukazuje tab. 3, kdy ze 700 náhodně vybraných případů by bylo pouze podle mikroskopického prověření 22 % výsledků mylných.

Na tomto příkladu je současně zřejmé, že k získání co největšího počtu správných výsled-

ků je zapotřebí bližší biochemická identifikace, neboť nestačí jen zjišťování tvorby kyseliny a plynu u kvasných metod, jak zdůrazňuje Skaliký (8) a Symon (9), nestačí ani odečítání na Endu pro častou růstovou atypii a rovněž nestačí, jak náš materiál dokazuje, mikroskopické vyšetření. Zjišťování gramnegativních tyček je

	gramnegativní tyčky z podezřelých kolonií na Endu	
	počet	%
skupina coli-aerogenes	545	77,9
ostatní mikroby	155	22,1
Celkem	700	100,0

Tab. 3. Početní a procentní zastoupení skupiny coli-aerogenes a ostatních mikrobů, reprezentovaných gramnegativními tyčkami

vhodné jen pro takové metody, které se snaží dokázat nikoliv jen skupinu coli-aerogenes, ale vůbec koliformní mikroby jako takové. S postupující precizací vyšetření se však tento způsob ukazuje jako nedostačující a nevyhovující.

Světová systémová díla Krasilnikova (5) a Bergeye (1) shodně uvádějí rozměry pro E. coli 0,5×1—3 mí, pro Aerobacter aerogenes 0,5 až 0,8×1—2 mí, s poznámkou o délkové variabilitě od kokobacilů až po tyčkovité řetízky. Naše výsledky u coli-aerogenes, zachycených z vody, délkovou variabilitu potvrzují, ač jako typickou délku u E. coli zjišťujeme tyčky spíše delší (2—5 mí), podobně jak uvádí Symon (8). Šířku u Aerobacter aerogenes shledáváme typickou pro uvedené rozmezí hodnot, zatímco u E. coli uvedenou hodnotu 0,5 mí nalézáme jako spodní hranici maximálního výskytu typických hodnot a nejvíce nalézanou šířku zaznamenáváme kolem 0,7 mí.

Postup, jakým jsme získali výsledky proměření koliformních mikrobů a podle kterých byly dělány závěry, není zcela korektní vzhledem k uznaným mikrobiologickým zásadám zjišťování morfologie mikrobů. Nutno zdůraznit, že tak bylo činěno záměrně, protože šlo o zachycení morfologických důsledků všech měnlivých faktorů, počínaje různým složením vzorků vod až po různé výrobní šarže půd, zcela tak, jak to odpovídá rutinní praxi při bakteriologickém vyšetřování pitných vod.

Závěr

1. Účelem práce je ozřejmit na materiálu z běžné praxe, jak dalece je účelné použití Gramova barvení při vyšetřování pitné vody na coli-aerogenes membránovými filtry nebo kvasnou zkouškou, zda se výsledků mikroskopického vyšetření dá použít pro zkrácené vyšetřování a je-li morfologická rozličnost mikrobů v použitelné závislosti na hledaných typech mikrobů ze skupiny coli-aerogenes, nebo k odlišení této

skupiny od ostatních ve vodě se vyskytujících mikrobů.

2. V běžné praxi je nutno považovat pouhé zjišťování gramnegativních tyček v mikroskopických preparátech, z kolonií vyrostlých na Endu, pro svou jednoznačnost za neúčelné v případech, kdy se provádí další, bližší biochemická identifikace, a za nedostačující, kdy představuje konečné vyšetření.

3. Morfologické poměry jsou u jednotlivých typů skupiny coli-aerogenes natolik proměnlivé a současně jsou tak dalece podobné poměrům ostatních ve vodě se vyskytujících mikrobů, že se ani po proměření mikrobů nedá použít výsledků mikroskopického vyšetření s použitelnou pravděpodobností ke zkrácenému vyšetřování.

4. Jako nejčastější mikronové hodnoty byly zjištěny u *E. coli*, zachycených z vody:

d = 3–4,5 mí (event. řetízková vlákna),

š = 0,5–0,8 mí, u *Aerobacter aerogenes*,
d = 1–3 mí, š = 0,5–0,6 mí.

Pisemnictví

1. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*, 7. edit., London 1957.
2. Halačka K. et al.: Vyšetřovací metody v hygieně, Praha 1957.
3. Hanuška L.: Biologické metody skúmania a hodnotenia vod, Bratislava 1956.
4. *Jednotné analytické metody*, Voda, Praha 1953.
5. Krasilnikov M. A.: Opređitel bakterij i aktinomycetov, Moskva 1959.
6. Kratochvíl I., Zmoray I.: Československá hygiena, I., 1:38–47, 1956.
7. Raška K. et al.: Mikrobiologické vyšetřovací metody, Praha 1958.
8. Skalický J.: Československá hygiena II., 7:405–411, 1957.
9. Symon K.: Hydrobiologický rozbor vody, Brno 1948.
10. Symon K. et al.: Vyšetřovací metody v hygieně, Praha 1954.
11. Tec V.: Mikrobiologja v hygiene, Martin 1956.