

О. І. Касяненко, С. М. Гладченко

МОРФОЛОГІЧНІ ТА КУЛЬТУРАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ІЗОЛЯТІВ *CAMPYLOBACTER SPP.*

Сумський національний аграрний університет

kas-oxana@mail.ru

Вступ. Членство України у світовій організації торгівлі відкриває як для потенційно потужної аграрної держави світу широкі можливості реалізації українських товарів високої якості практично на всіх світових ринках. Водночас членство в СОТ вимагає однакових вимог до якості та безпечності продукції національного виробництва як для внутрішнього споживання, так і для експорту. Актуальним і нагальним є реалізація державної програми з розробки методик визначень показників мікробіологічної безпечності сировини та харчових продуктів щодо основних патогенів – збудників антропоознозів, до яких відносяться мікроорганізми роду *Campylobacter* [4].

Мікробіологічна безпека харчових продуктів щодо збудників кишкових інфекцій, таких як бактерії роду *Campylobacter*, є актуальною проблемою. Виявлення збудника на етапах виробництва, переробки, зберігання та реалізації продукції птахівництва вимагає розробки нових і вдосконалення існуючих методів діагностики. Незважаючи на те, що згадані мікроорганізми давно відомі, останніми роками реєструється збільшення відносної кількості випадків інфекції, яку вони спричиняють. Збудником кампілобактеріозу є термофільні бактерії роду *Campylobacter*: *C. jejuni*, *C. coli* і *C. lari*. Ці види патогенів найчастіше ізолюються із м'яса бройлерів. Донині недостатньо вивчені: рівні поширення *Campylobacter spp.* серед забійної птиці і мікробіологічного забруднення продукції птахівництва, що виробляється в Україні; біологічні властивості ізолятів. Актуальними залишаються питання удосконалення діагностики кампілобактеріозу, розробка стратегії контролю епізоотичного процесу цієї інфекції, методи отримання якісної й безпечної продукції птахівництва [5–9].

Метою роботи було дослідити морфологічні та культуральні властивості циркулюючих штамів кампілобактерій.

Матеріали і методи досліджень. Для проведення досліджень використовували прилади і діагностичні засоби (тест-системи, реактиви), поживні середовища згідно з ДСТУ ISO/TS 11133-1:2005, лабораторний посуд і лабораторне обладнання згідно з ДСТУ ISO 1042:2005. Приготування реактивів та розчинів, що використовувалися під час досліджень, проводили згідно з ДСТУ ГОСТ 4919:2008. В експериментах використовували ізоляти *Campylobacter spp.*, виділені із продукції птахівництва. Ізоляцію

та ідентифікацію кампілобактерій із харчових продуктів здійснювали відповідно до міжнародного стандарту (ДСТУ ISO 10272-1:2007 Мікробіологія харчових продуктів та кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахунку кампілобактерій. Ч. 1. Метод виявлення (ISO 10272-1:2006, DT).

Як поживні середовища використовували основу агару для бруцел Brucella Agar Base M 074, M 994 («HiMedia», India), м'ясо-пептонний печінковий агар (МППА), м'ясо-пептонний агар (МПА), м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), Ендо, Левіна, Кітта-Тароцці, тіогліколеве середовище, Preston agar, бульйон Болтона, Abeyta-Hunt-Bark agar, mCCD agar. Контроль стерильності поживних середовищ проводили за ДСТУ 4483:2005. Використовували також селективну добавку «Oxoid Selective Supplement SR085E» виробництва фірми «Oxoid» (England).

Результати досліджень та їх обговорення. Ізоляти кампілобактерій грамнегативні поліморфні, злегка зігнуті тонкі палички. Окремі бактерії поєднувалися в короткі ланцюжки і утворювали форму, що нагадувала крила чайки, яка летить; латинської літери S; коми, тощо. Збудник фарбувався аніліновими фарбниками і фуксином Пфейфера в розведенні 1:5. В молодих культурах (24 години культивування) переважали типові злегка зігнуті бактеріальні клітини. З часом культивування виявляли поліморфізм збудників, який характеризувався поступовою трансформацією бактеріальних клітин у кокоподібні форми. Так, при мікроскопії мазків 3–4-добових культур *Campylobacter jejuni* пофарбованих фуксином Пфейфера в основному виявляли трансформовані кокоподібної форми бактерій, а при мікроскопії мазків 6-добових культур збудника – лише кокоподібні (рис. 1 а, б).

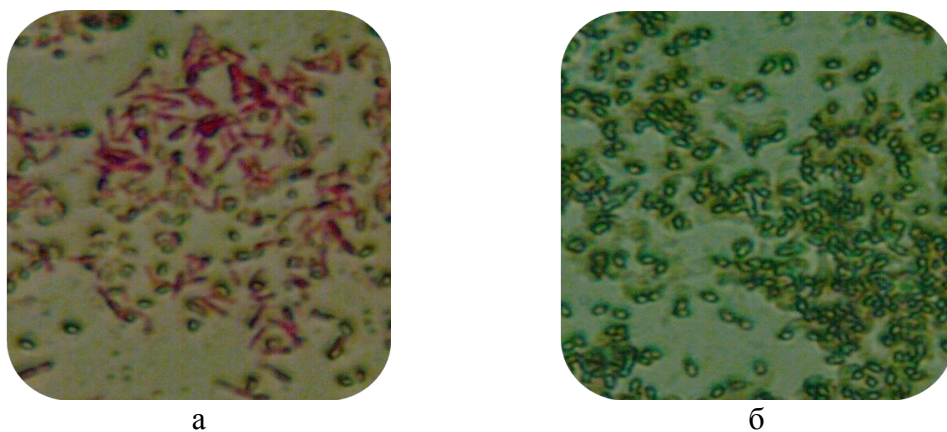
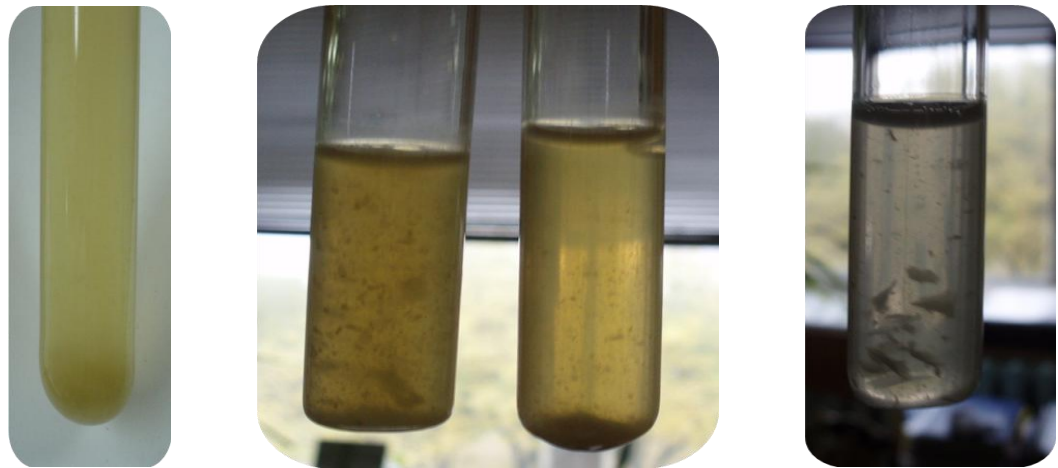


Рис. 1. Морфологія *Campylobacter jejuni* в мазку пофарбованому фуксином Пфейфера в розведенні 1:5: а – 3-добова культура збудника; б – 6-добова (ок. 10, об. 90)

Ізоляти *Campylobacter spp.* всіх видів росли в мікроаерофільних умовах у діапазоні температур 37–42 С. При культивуванні в рідких поживних середовищах культури кампілобактерій через 24 години утворюють незначне помутніння, з пухким осадом на дні

пробірки. Іноді культури мікроорганізмів утворювали осад, який при струшуванні перетворювався на великі, середнього розміру та дрібні пластівці, що піднімалися до поверхні поживного середовища (рис. 2).



а

б

в

Рис. 2. Ріст культур кампілобактерій в рідких поживних середовищах: а – ріст на бульйоні Престон; б – ріст *C. jejuni* на МПБ; в – *Campylobacter spp.* ріст *C. jejuni* на бульйоні для бруцел

На щільних поживних середовищах ріст кампілобактерій виявляли через 48–96 годин культивування в термофільних і капнофільних умовах у вигляді дрібних вологих, блискучих, прозорих колоній матового забарвлення, які важко виявити неозброєним оком. Виявляли добре оконтуровані дрібні колонії круглої форми, помірно випуклі, які важко піддавалися візуальній індикації і поступово вони досягали 1–3 мм у діаметрі (рис. 3).

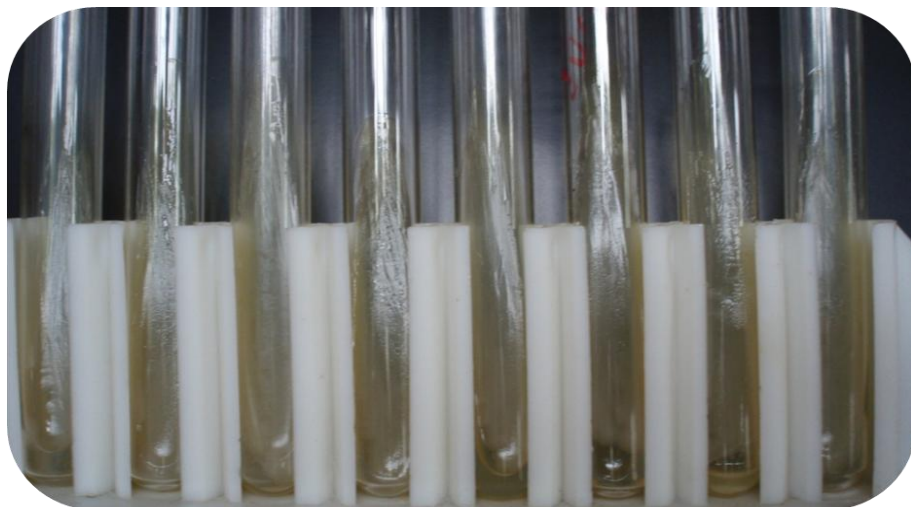


Рис. 3. Колонії *Campylobacter spp.* на поверхні щільного поживного середовища Preston через 72 години культивування

Також реєстрували ріст *Campylobacter spp.* у вигляді скловидного нашарування серед якого виділялися дуже дрібні прозорі колонії округлої форми (S - форма).

З часом культивування колонії *Campylobacter spp.* збільшувалися в діаметрі до 7–9

мм і мали вигляд матових добре оконтурованих із злегка ущільненим і припіднятим центром та периферією колоній. Колонії *C. lari* на щільному середовищі ставали видимими через 3 доби і досягали максимальних розмірів (1 мм в діаметрі) через 5–7 діб інкубації. На поверхні поживного середовища Preston з 7 % крові барана колонії *Campylobacter spp.* утворювали суцільне нашарування у вигляді вологої плівки ніжно-кремового кольору (рис. 4 б). Ознаки росту культур на середовище Ендо виявляли через 48–96 годин культивування в мікроаерофільних умовах при температурі культивування 37° С та 42° С. Колонії мали округлу форму, опуклі, дрібні, рожеві без блиску (рис. 5 а).



Рис. 4. Колонії *Campylobacter jejuni* на поверхні щільних поживних середовища через 72 години культивування: а – середовище HiMedia М 994;
б – середовище Preston з 7 % крові барана

При культивуванні *Campylobacter spp.* в напіврідкому поживному середовищі МППА вже через 48 години колонії мали вигляд ніжних сіруватих дисків під поверхнею поживного середовища (рис. 5 б). На середовищі Кітт-Тароцці ріст виявили лише через 96 годин культивування у вигляді ледь помітного вуалеподібного осаду на дні пробірки (рис. 6).

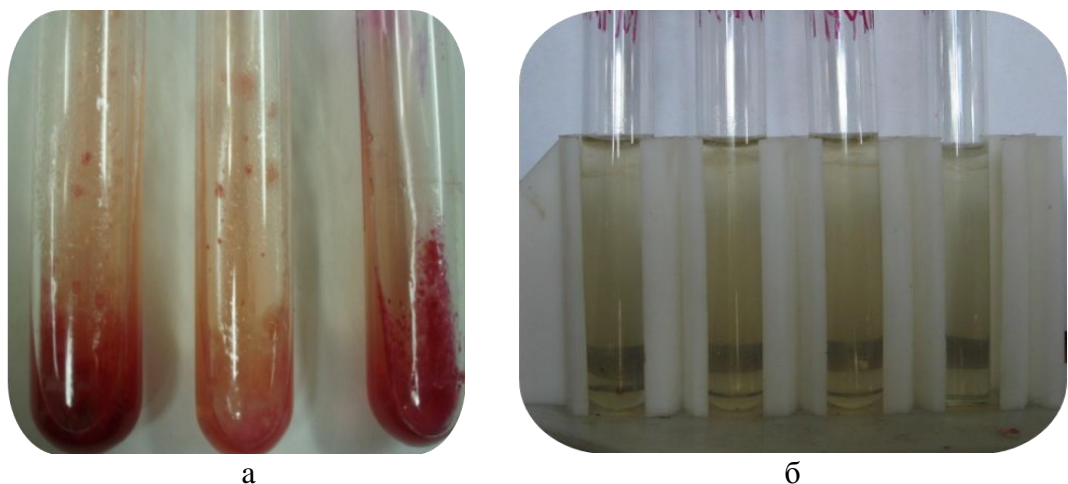


Рис. 5. Колонії кампілобактерій: а – на середовищі Ендо, б – в напіврідкому МППА

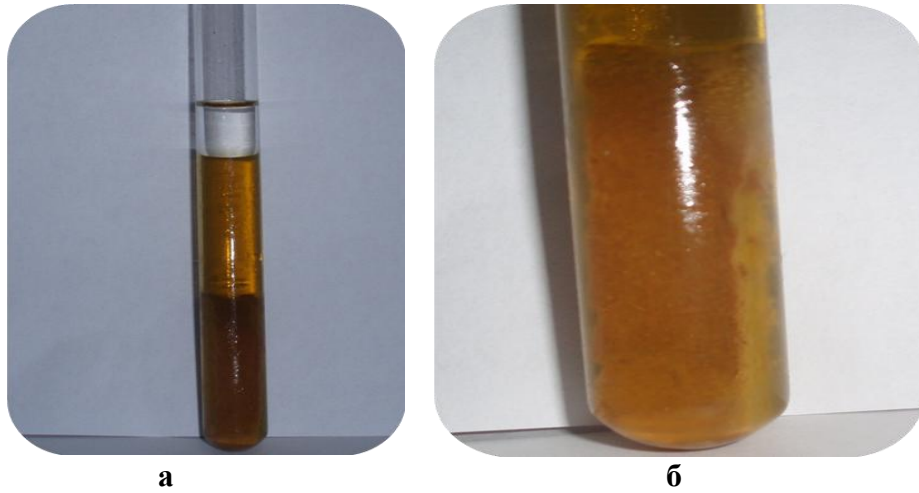


Рис. 6. Ріст *Campylobacter spp.* на середовищі Кітт-Тароцці

Диференціацію та ідентифікацію ізолятів кампілобактерій проводили за біохімічними властивостями. Перевірку і підтвердження видової ідентифікації – за біохімічними тестами, порівнюючи результати з тест-культурами кампілобактерій, отриманих із депозитарію ФГУ «ВГНКИ» м. Москва. За результатами мікроскопії та здатністю культур продукувати каталазу та оксидазу досліджувані мікроорганізми належали до роду *Campylobacter*. Ріст за культивування при температурі 37° С та 42° С та за відсутності ознак росту культур при 25° С ідентифікували *C. jejuni* від *C. coli*, *C. fetus*, *C. venerialis* і *C. bubulus*. *C. jejuni* на відміну від інших видів кампілобактерій були чутливими до брильянтової зелені у розведенні 1: 100000; через 72 год. культивування реєстрували швидкий перехід у кокову форму. Основна ознака, за якою проводили ідентифікували *C. jejuni* від інших кампілобактерій – здатність досліджуваних культур до швидкого гідролізу гіпурату натрію (рис. 7).

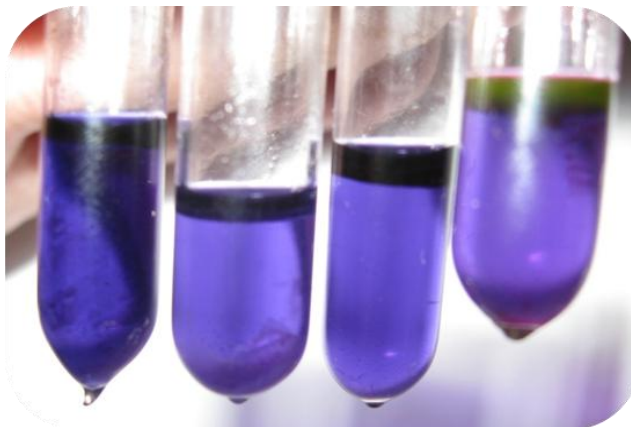


Рис. 7. Ідентифікація *C. jejuni* в реакції гідролізу гіпурату натрію (позитивна реакція)

Ізоляти *C. jejuni*, *C. coli* не продукували сірководню при культивуванні на трицукровому агарі, тоді як у процесі культивування на МППА всі ізоляти кампілобактерій виділяли H₂S, окрім підвиду *C. venerealis*, що перевірявся як тест-культура. Ізоляти *C. coli* на відміну від *C. jejuni* проявляли резистентність до брильянтової

зелені в розведенні 1:100000. На підставі температурного тесту встановлено, що за мікроаерофільних умов культивування *C. lari* мали ознаки росту лише при температурі 37 °С. За результатами температурного тесту, здатністю культур продукувати сірководень на трицукровому агарі, виявлення їх росту на поживних середовищах з 3,5 % хлориду натрію та визначенням резистентності до налідиксової кислоти і діамантової зелені в розведенні 1:33000, а також за відсутності здатності відновлювати нітрати до нітритів ізоляти кампілобактерії ідентифікували як вид *C. lari*.

При ідентифікації кампілобактерій досить важливе значення мали результати досліджень щодо стійкості штамів до хімічних речовин. Кампілобактерії підвиду *C. jejuni*, видів *C. lari* і *C. coli* проявляли резистентність до цефалотину (диски 30 мг/см³); *C. jejuni* та *C. coli* – чутливість до налідиксової кислоти (диски 30 мг/см³), а також діамантової зелені в розведенні, відповідно, 1:100000, 1:33000. Ізоляти *C. coli* та *C. lari* були чутливими до трифенілтетразолію (04 мг/см³).

Отже, з метою типізації *Campylobacter spp.*, що мають діагностичне значення (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*) доцільно застосовувати біохімічні маркери: каталазну та оксидазну активність, здатність до швидкого гідролізу гіпурату натрію, продукцію сірководню і чутливість до налідиксової кислоти та цефалотину.

Висновки.

1. Встановлено, що ізольовані штами кампілобактерій мали вигляд грамнегативних поліморфних, злегка зігнутих тонких, рухливих паличок. З часом культивування виявляли поліморфізм збудників, який характеризувався поступовою трансформацією бактеріальних клітин у кокоподібні форми: при мікроскопії мазків 3–4-добових культур *Campylobacter jejuni* пофарбованих виявляли трансформовані кокоподібної форми бактерій, а при мікроскопії мазків 6-добових культур збудника – лише кокоподібні.

2. За культивування в рідких поживних середовищах культури *Campylobacter spp.* у мікроаерофільних умовах за температури 37–42° С через 24–48 год утворюють незначне помутніння з пухким осадом на дні пробірки; на щільних – через 48–96 год культивування формують дрібні вологі, блискучі, прозорі колонії матового кольору; в напіврідких – через 24–48 год колонії мали вигляд ніжних сіруватих дисків під поверхнею середовища.

3. Ізоляти кампілобактерій продукували каталазу та оксидазу; *C. jejuni* здатні до гідролізу гіпурату натрію, чутливі до діамантового зеленого у розведенні 1:100000, ознак росту культур немає за температури 25° С. Ізоляти *C. coli* резистентні до діамантового зеленого в розведенні 1:100000. Культури *C. lari* мали ознаки росту лише за температури 37° С, продукували сірководень на трицукровому агарі, росли на поживних середовищах

із 3,5 % натрію хлориду, резистентності до налідиксової кислоти і діамантового зеленого в розведенні 1:33000, не відновлювали нітрати до нітритів.

Література.

1. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Настанови щодо готування та виробництва поживних середовищ. Частина 1. Загальні настанови щодо виготовлення поживних середовищ гарантованої якості в лабораторії (ISO/TS 11133-1:2000, IDT): ДСТУ ISO/TS 11133-1:2005. – [Чинний від 2008-03-01]. – К.: Держспоживстандарт України 2008. – 23 с. (Національний стандарт України).
2. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення і підрахунку кампілобактерій (*Campylobacter spp.*). Частина 1. Метод виявлення (ISO 10272-1:2006, IDT) : ДСТУ ISO 10272-1:2007. – [Чинний від 2006-08-03]. – К.: Держспоживстандарт України, 2007. – 28 с. – (Національний стандарт України).
3. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Загальні настанови мікробіологічних досліджень (ISO 7218:1996, IDT) : ДСТУ ISO 7218:2008. – [Чинний від 2011-01-01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2008. – 11 с. – (Національний стандарт України).
4. Вербицький П. І. Спільні зусилля на сторожі якості й безпеки продукції (з прес-конференції) / П. І. Вербицький // Ветеринарна медицина України. – 2009. – № 3. – С. 8.
5. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses in the EU, 2010 / European Food Safety Authority, 2010 a Part A : *Campylobacter* and *Salmonella* prevalence estimates // The EFSA Journal. – 2011. – № 8(03). – 1503 p.
6. Murphy C. The effect of different media on the survival and induction of stress responses by *Campylobacter jejuni* / C. Murphy, C. Carroll, K. N. Jordan // Journal of Microbiological Methods.– 2005. – Vol. 62, Iss. 2. – P. 161–166.
7. Pasquali F. *Campylobacter* control in poultry production / F. Pasquali // 14 World's Poultry Science Journal. – 2011. – Vol. 67. – P. 214–243.
8. Slutsker L. Foodborne diseases: Emerging Pathogens and Trends / L. Slutsker, S. Altekruze, D. Swerdlow // Infectious Disease Clinics of North America. – 1998. – Vol. 12, Iss. 1. – P. 199–216.
9. Stephen J. Epidemiology of diarrhoeal diseases in developed countries / J. Stephen, A. Savarino, L. Bourgeois // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 1993. – Vol. 87. – P. 7–11.

УДК 619.5:6616-085.636.5

Морфологічні та культуральні властивості ізолятів *Campylobacter* spp.

*В статті наведені і проаналізовані результати досліджень щодо вивчення особливостей морфологічних ознак кампілобактерій, які були ізольовані із м'яса птиці. Наведені дані щодо культуральних властивостей *Campylobacter* spp. за культивування в рідких, щільних та напіврідких поживних середовищах. Враховуючи отримані результати щодо морфологічних властивостей і особливості культивування даних мікроорганізмів були проведені дослідження щодо диференціації та ідентифікації мікроорганізмів роду *Campylobacter*.*

Ключові слова: ізоляти, мікроорганізми, бактерії, культури, культивування, морфологія, колонії, живильні середовища, диференціація, ідентифікація.

УДК 619.5:6616-085.636.5

Морфологические и культуральные свойства изолятов *Campylobacter* spp.

*В статье приведенные и проанализированные результаты исследований относительно изучения особенностей морфологических признаков кампилобактерий, которые были изолированы из мяса птицы. Приведенные данные относительно культуральных свойств *Campylobacter* spp. при культивировании в жидких, плотных и полужидких питательных средах. Учитывая полученные результаты относительно морфологических свойств и особенности культивирования данных микроорганизмов были проведенные исследования относительно дифференциации и идентификации микроорганизмов рода *Campylobacter*.*

Ключевые слова: изоляты, микроорганизмы, бактерии, культуры, культивирование, морфология, колонии, питательные среды, дифференциация, идентификация.

УДК 619.5:6616-085.636.5

Morphological and cultural properties of isolates of *Campylobacter* spp.

*The article describes and analyzes the results of researches on studying features of morphological signs of *Campylobacter*, which were isolated from poultry. The shown data regarding cultural properties *Campylobacter* spp. at cultivation of liquid, dense and semi-liquid nutrient mediums. Considering the results obtained relatively morphological properties and features of cultivation of these microorganisms have been conducted research on differentiation and identification of microorganisms of the genus *Campylobacter*.*

Key words: isolates, microorganisms, bacteria, cultures, cultivation, morphology, colonies, nutritional environments, differentiation, identification.