

УДК 576.8.095

МИКРОБИОЛОГИЯ

А. М. Диланян

**Активная кислотность в культурах возбудителей колиэнтеритов
и банальной *Escherichia coli* при ферментации различных
углеводов**

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР Э. Г. Африкяном 10/11 1976)

Нормальная микрофлора желудочно-кишечного тракта человека привлекает внимание исследователей в различных аспектах патологии.

Желудок и 12-перстная кишка практически стерильны благодаря бактерицидному действию соляной кислоты желудка. Верхний отдел тонких кишок обсеменен энтерококками, которые резистентны к соляной кислоте. В среднем и нижнем отделах тонких кишок встречаются молочнокислые и ацидофильные бактерии, которые создавая кислую реакцию в тонких кишках предохраняют их от проникновения бактерий группы *coli-aerogenes* из толстых кишок, где имеется нейтральная реакция. При повышенной кислотности желудка энтерококки доходят до толстых кишок и вытесняют другие виды микроорганизмов. При ахилии количество энтерококков резко уменьшается, устанавливается нейтральная или щелочная реакция в тонких кишках и бактерии группы *coli-aerogenes* проникают восходящим путем до желудка (¹). Так, были выделены у ахиликов из желудка в 75% случаев кишечные палочки (²). В культурах кишечной палочки изучали зависимость дезаминирования и рН среды (³), влияние изменения рН среды на фаготитлаж прибавлением глюкозы к питательному агару (⁴).

Нами были изучены количественные сдвиги активной кислотности (рН) в эталонных культурах энтеропатогенных и апатогенных штаммов *Escherichia coli* Castellani et Chalmers, 1919, 941. В настоящем сообщении номенклатура исследуемых штаммов приведена по руководству Берге (Bergey) и по „Проекту Международного кодекса номенклатуры бактерий“ (^{5,6}). В соответствии современным правилам номенклатуры бактерий нам представляется необходимым назвать *Escherichia coli* сахарозонерасщепляющий биовар и *Escherichia coli* сахарозорасщепляющий биовар вместо старых названий *Escherichia coli*, var. *communis* Breed (синоним: *Bacterium coli commune* Escherich, 1885) и *Escherichia coli*, var. *communior* Yale, 1939 (синонимы: *Bacil-*

E. coli communior Durham, 1900, *Bacterium coli, var. communior* Topley a. Wilson, 1931) (⁷). Часть культур выделена в СССР, а другая часть — за рубежом, о чем подробно сказано в одной из наших работ (⁸).

Итак, нами было изучено изменение концентрации водородных ионов в динамике в эталонных культурах энтеропатогенных *E. coli* серовары O111 : B4 (№ 24), O55 : B5 (№ 155), O26 : B6 (№ 157), O86 : B7 (№ E-990), O20 : K84 (№ 145) и *E. coli* № 408. Для сравнения были использованы по три штамма апатогенные *E. coli* нерасщепляющей сахарозу и *E. coli* расщепляющей сахарозу.

Исследования изменений активной кислотности—рН при ферментации различных углеводов патогенными и апатогенными *E. coli* производили электрометрическим способом, рН-метром «ЛП-5» с применением каломельного и стеклянного малых электродов. рН-метрию проводили ежечасно в течение 24 часов. В качестве питательной среды употребляли среду Кларка и модифицируя ее добавлением отдельных углеводов в равном количестве вместо глюкозы. Для всех опытов применяли определенное одинаковое количество бактериальных клеток—с расчета $2 \cdot 10^5$ клеток на 10 мл среды, смывых физиологическим раствором с агаровой культуры. Опыты ставили в трехкратной повторности. Средние данные рН в динамике изменения по шести культур патогенной и апатогенной *E. coli* приведены на графиках (рис. 1—3).

Данные по изучению ферментации моносахаридов *E. coli* показывают, что энтеропатогенные штаммы обладают более сильно выраженной кислотообразующей способностью, чем апатогенные *E. coli* (рис. 1).

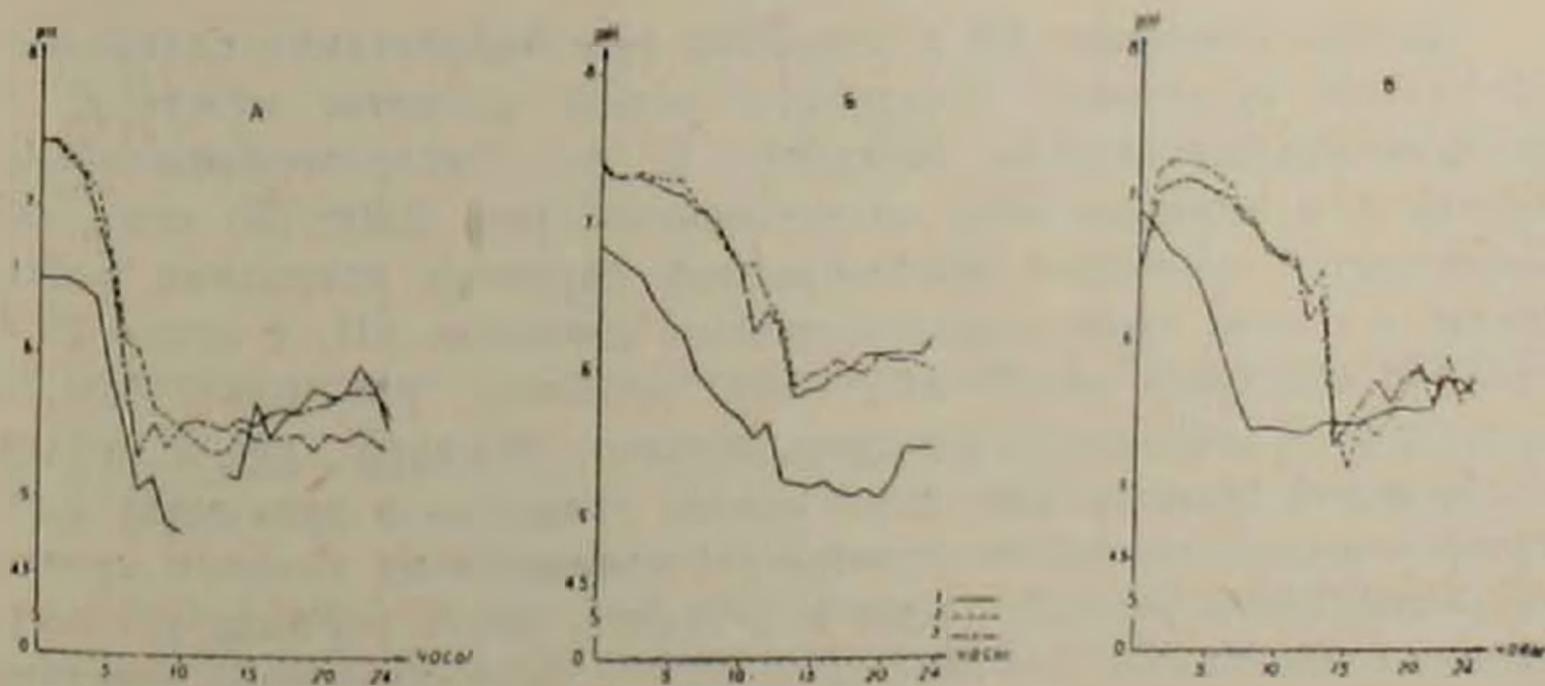


Рис. 1. Динамика изменения рН в культурах энтеропатогенных и апатогенных *E. coli* при ферментации моносахаридов (А—глюкоза; Б—галактоза; В—арабиноза).

Обозначения: 1—энтеропатогенные *E. coli*;
 апатогенные *E. coli*; 2—*E. coli* сахарозонерасщепляющий биовар;
 3—*E. coli* сахарозорасщепляющий биовар

Динамика изменения рН при ферментации глюкозы, галактозы и арабинозы до 24 часов инкубации различна. После максимального спада рН, т. е. полного расщепления моносахаридов, намечаемый подъем рН, по-видимому, можно объяснить образованием аммиака в культурах.

При ферментации лактозы *E. coli* имеется совпадение динамики изменения рН в культурах, с небольшим преимуществом кислотообразующей функции у энтеропатогенных штаммов (рис. 2,А).

При ферментации мальтозы *E. coli* резко расходятся данные рН-метрии: возбудители колиэнтеритов обладают очень сильно-выраженной кислотообразующей функцией (рис. 2,Б).

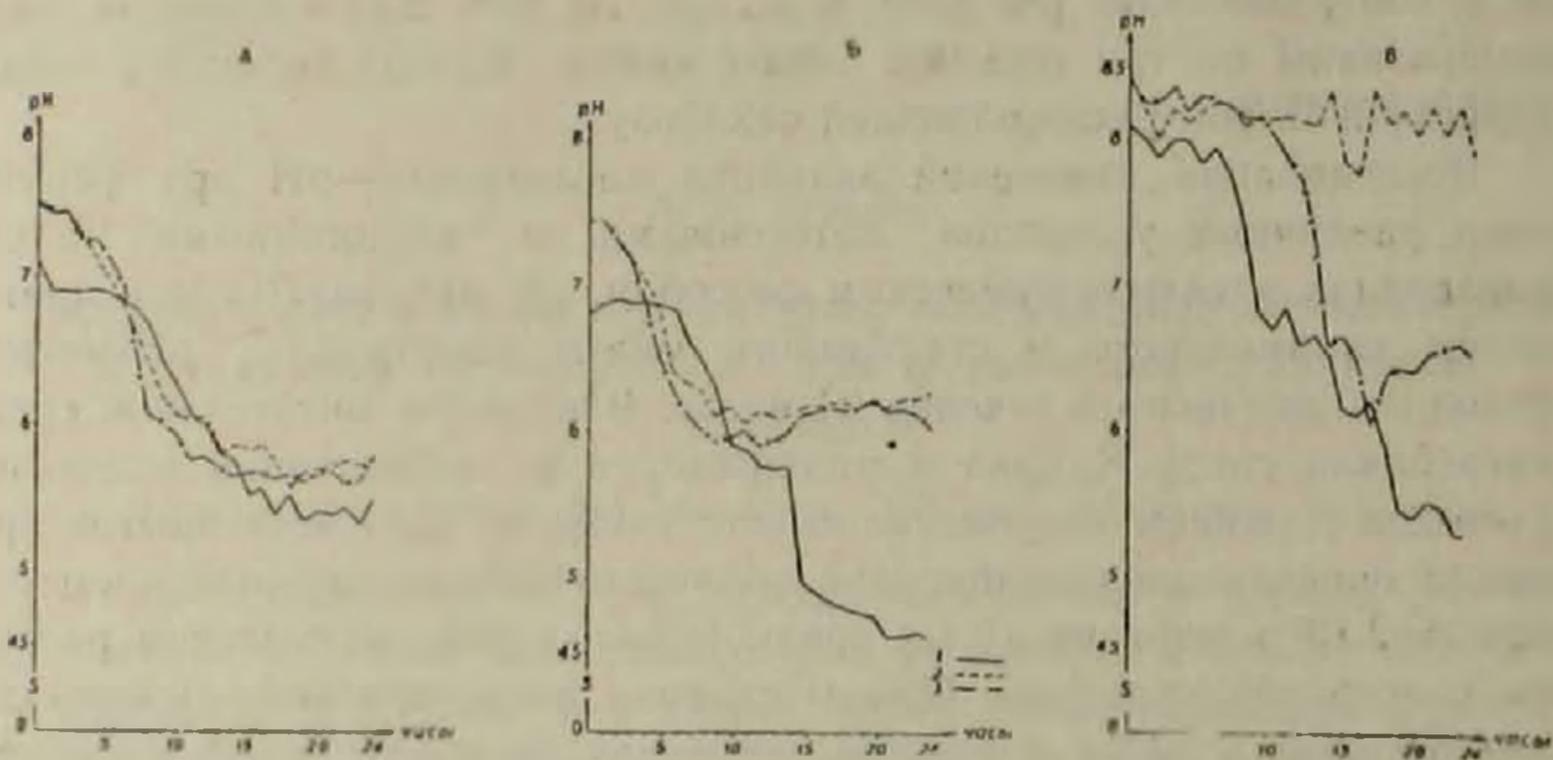


Рис. 2. Динамика изменения рН в культурах энтеропатогенных и апатогенных *E. coli* при ферментации дисахаридов (А—лактоза, Б—мальтоза, В—сахароза).

Обозначения: 1—энтеропатогенные *E. coli*; апатогенные *E. coli*; 2—*E. coli* сахарозонерасщепляющий биовар, 3—*E. coli* сахарозорасщепляющий биовар

Данные изменения рН в динамике при ферментации сахарозы испытываемыми культурами показывают резкое различие между *E. coli* сахарозонерасщепляющим биоваром, *E. coli* сахарозорасщепляющим биоваром и возбудителями колиэнтеритов (рис. 2,В). До семи часов наблюдается некоторый волнообразный характер изменения реакции среды, а с семи часов зарегистрировано снижение рН; к концу 23—24 часам в культурах энтеропатогенных штаммов рН равен 5,31, а в культурах *E. coli* сахарозорасщепляющего биовара рН в пределах слабокислой реакции. При ферментации сахарозы в культурах *E. coli* сахарозонерасщепляющего биовара рН находится на высоком уровне—сильнощелочной реакции среды и в течение всего периода рН-метрии кривая волнообразна, что свидетельствует о ферментативной реактивности *E. coli*. В культурах *E. coli* сахарозорасщепляющего биовара кривая рН неуклонно падает с семи часов инкубации, выравниваясь с кривой рН энтеропатогенных штаммов *E. coli*, затем слегка снижается и вновь повышается до слабокислой реакции, занимая промежуточное положение между *E. coli* сахарозонерасщепляющим биоваром и патогенными штаммами *E. coli*. Эти данные еще раз подтверждают результаты наших предыдущих исследований о том, что при изменчивости *E. coli* и приобретения патогенных свойств, наряду с другими факторами патогенности, они приобретают способность разлагать сахарозу.

Таким образом, рН-метрией выявлено резкое различие между энтеропатогенными *E. coli*, *E. coli* сахарозорасщепляющим биоваром и *E. coli* сахарозонерасщепляющим биоваром. Кислотообразующая функция выражена очень сильно у возбудителей колиэнтеритов, а *E. coli* сахарозорасщепляющий биовар занимает промежуточное положение между патогенными *E. coli* и *E. coli* сахарозонерасщепляющим биоваром. Приведенные экспериментальные данные по ферментации дисахаридов патогенными и апатогенными *E. coli* показывают, что первые обладают более сильной кислотообразующей способностью, особенно при расщеплении мальтозы и сахарозы, чем апатогенные *E. coli*.

Кривые рН при ферментации маннита патогенной *E. coli* и *E. coli* сахарозорасщепляющим биоваром снижаются параллельно до двенадцати часов инкубации, затем они резко расходятся: в культурах *E. coli* сахарозонерасщепляющего биовара рН сильно повышается, но реакция среды остается в слабокислой зоне; в культурах *E. coli* сахарозорасщепляющего биовара сравнительно в меньшей мере рН повышается небольшими амплитудами, приближаясь по величине рН *E. coli* сахарозонерасщепляющего биовара (рис. 3, А). Энтеропатогенные штаммы снижают рН до значительно кислой реакции среды.

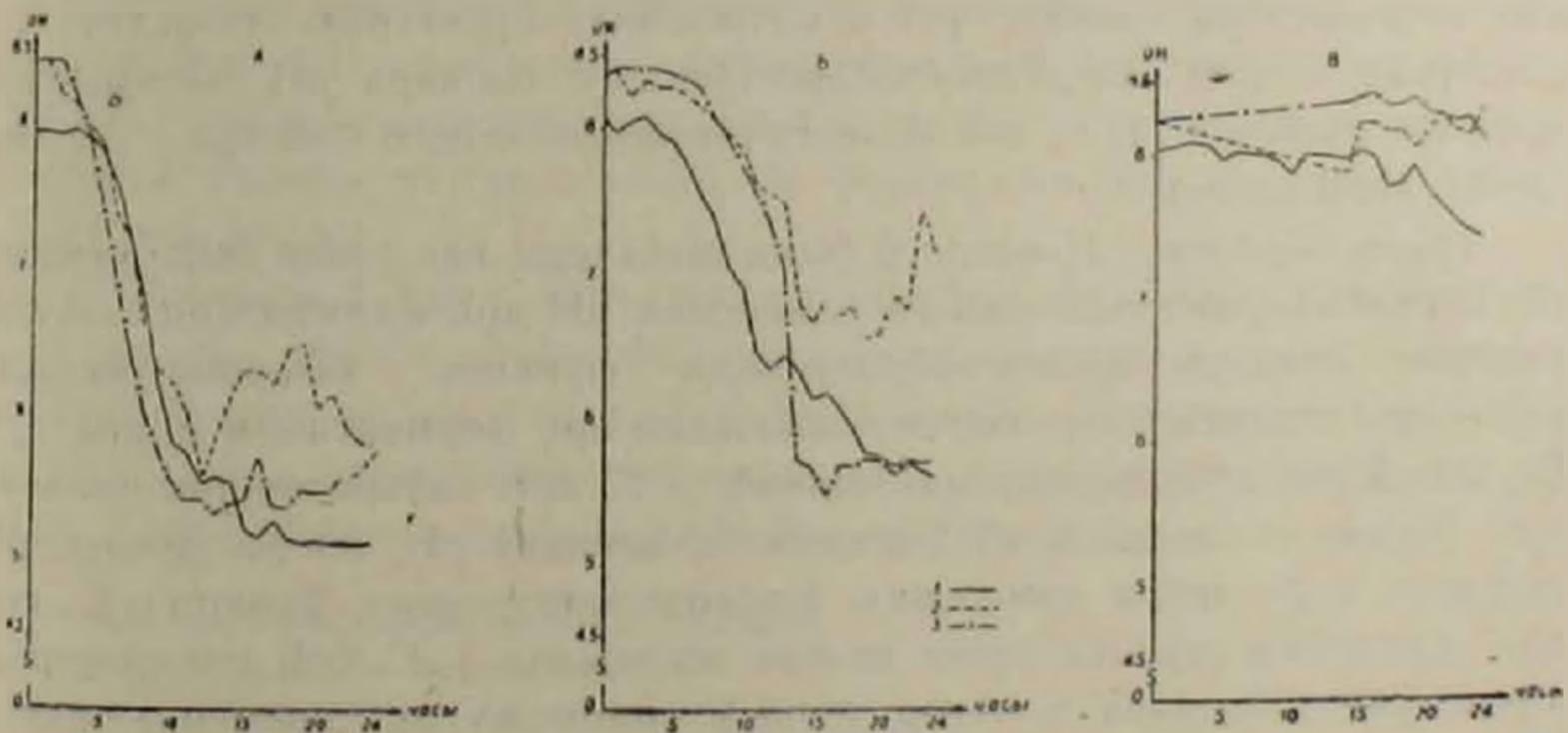


Рис. 3. Динамика изменения рН в культурах энтеропатогенных и апатогенных *E. coli* при ферментации шестнатомных спиртов (А—маннит; Б—сорбит; В—дульцит).

Обозначения: 1—энтеропатогенные *E. coli*;
 апатогенные *E. coli*; 2—*E. coli* сахарозонерасщепляющий биовар,
 3—*E. coli* сахарозорасщепляющий биовар

При ферментации сорбита, *E. coli* сахарозорасщепляющий биовар сбраживает сорбит более интенсивно, чем возбудители колиэнтеритов, но с восемнадцати до 24-х часов величины рН в культурах этих двух биоваров *E. coli* находились на одном уровне (рис. 3,Б). Сопоставление кривых по динамике изменения рН в культурах *E. coli* при сбраживании сорбита и глюкозы показывает определенное сходство кривых патогенных *E. coli* и *E. coli* сахарозорасщепляющего биовара, а также и различие с *E. coli* сахарозонерасщепляющим биоваром. При сбражи-

вании сорбита *E. coli* сахарозонерасщепляющим биоваром реакция среды находится в пределах слабокислой и щелочной зоны, а при сбраживании глюкозы спустя 18 часов реакция среды в культуре *E. coli* сахарозонерасщепляющего биовара более кислая, чем в культурах патогенных *E. coli*.

Таким образом, при сбраживании сорбита в определенный промежуток времени кислотообразующая способность *E. coli* сахарозорасщепляющего биовара сильнее, чем у патогенных *E. coli*, а у *E. coli* сахарозонерасщепляющего биовара реакция среды находилась в пределах слабокислой и щелочной зоны.

В динамике изменения рН при расщеплении дульцита возбудителями колиэнтеритов, *E. coli* сахарозорасщепляющим биоваром и *E. coli* сахарозонерасщепляющим биоваром имеется определенное различие, что не может привлечь внимание исследователя при обычных визуальных тестах изучения биохимических свойств бактерий (рис. 3, В). Общеизвестно, что при окислении дульцита образуется галактоза. Сравнивая наши кривые ферментации дульцита и галактозы, можно отметить, что ферментативная активность выше у патогенных кишечных палочек, чем у банальной *E. coli*. При расщеплении дульцита уровень рН в культурах *E. coli* и патогенных *E. coli* сближается, но со второй половины опыта кривые расходятся: рН в патогенных культурах снижается; в культурах *E. coli* сахарозонерасщепляющего биовара рН повышается, сходится с кривой рН *E. coli* сахарозорасщепляющего биовара с тенденцией к повышению.

Таким образом, рН-метрией были выявлены как резко выраженные, так и слабо выраженные сдвиги изменения рН при ферментации шестиатомных спиртов. Кислотообразующая функция энтеропатогенных кишечных палочек более сильно выражена при ферментации маннита, а *E. coli* сахарозорасщепляющий биовар и *E. coli* сахарозонерасщепляющий биовар отличаются по динамике изменения рН, но по уровню рН сходятся к 24 часам измерения. Кислотообразующая функция *E. coli* при окислении сорбита более сильно выражена у *E. coli* сахарозорасщепляющего биовара в определенный промежуток времени, затем сближается с величиной рН энтеропатогенных штаммов. Отмечается высокий уровень рН в культурах *E. coli* сахарозонерасщепляющего биовара. В дульцитосодержащей питательной среде во всех культурах уровень рН очень высок, особенно у банальной *E. coli*.

Полученный экспериментальный материал был обработан непараметрическим критерием статистики (⁹). Для выявления различий между патогенными и апатогенными кишечными палочками, при ферментации различных углеводов по разностям рН с начальной реакцией среды, мы применили критерий U (Вилкоксона—Манна—Уитни).

Результаты статистической обработки показали, что данные рН-метрии позволяют утверждать, что при ферментации галактозы, арабинозы, мальтозы, сахарозы, дульцита различия между двумя взятыми рядами чисел по разности рН в своих средних тенденциях являются существенными, следовательно, нулевую гипотезу можно отвергнуть, а при фер-

ментации лактозы, маннита и сорбита различия незначительны, т. е. нулевая гипотеза может быть принята.

Нами выявлено четкое различие в динамике и интенсивности кислотообразования в жидких культурах энтеропатогенных *E. coli*, *E. coli* сахарозорасщепляющего биовара и *E. coli* сахарозонерасщепляющего биовара путем электрометрического определения концентрации водородных ионов при ферментации моносахаридов, дисахаридов и шестиатомных спиртов.

Применение рН-метрии при изучении биохимических свойств энтеробактерий позволяет получить ценные информации до 24 часов инкубации, но желательно проводить наблюдения и в более продолжительные сроки, как это обычно принято делать визуальными качественными тестами—пестрые ряды.

Повышенная кислотообразующая способность энтеропатогенных *E. coli* является, по-видимому, одним из главных факторов ее патогенности при колиэнтеритах, способствующей усиленному размножению в кислой среде тонких кишок, т. е. вирулентности *E. coli*. Воздействием продуктов жизнедеятельности на макроорганизм она вызывает острые кишечные инфекции, а при ахилии, достигая до желудка, могут иметь определенное значение в этиопатогенезе и других заболеваний.

Для биохимической характеристики изученных банальных штаммов *Escherichia coli* предлагаем применение инфраподвидового названия *E. coli* сахарозонерасщепляющий биовар и *E. coli* сахарозорасщепляющий биовар соответственно их ферментативной активности к данному субстрату.

Полученный нами фактический материал позволяет рекомендовать рН-метрию для изучения биохимических свойств микроорганизмов с целью получения количественной информации об активной кислотности в культурах, ферментативной активности-кислотообразующей функции для характеристики их биологических особенностей.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Армянской ССР

Ա. Մ. ԳԻՎԱՆՅԱՆ

Ակտիվ քրվայնությունը կոլիէնտերիաների հաբուցիչների և ոչ պաթոգեն *Escherichia coli* կոկտուրաներում տարբեր ածխաջրատների ֆերմենտացիայի ժամանակ

Այս աշխատանքում շարադրվում է ախտածին և ոչ ախտածին *E. coli* հեղուկ կոկտուրաներում рН դինամիկ փոփոխությունները մեկ օրվա ընթացքում՝ յուրաքանչյուր ժամ կատարվել է էլեկտրոմետրիկ չափումներ մոնոսախարիդների, դիսախարիդների և վեցատոմանի ալկոհոլների խմորման ընթացքում:

Էքսպերիմենտալ սովյալները բերված են իննը դժագրով, այդ սովյալները մշակված են վիճակագրության ոչ պարամետրիկ «U» չափանիշով (Վիկոկսոնի-Մաննա-Ուիտնի չափանիշ):

Հաջողվել է ի հայտ բերել էնտերոպաթոգեն և ոչ պաթոգեն *E. coli* հեղուկ կուլտուրաներում ցայտուն տարբերություն նրանց թթվաառաջացման հատկության միջև վերև նշված ածխաջրատների ֆերմենտացիայի ընթացքում: Ախտածին *E. coli* օժտված է ավելի ուժեղ թթվաառաջացման ֆունկցիայով, որով և, հավանաբար, պայմանավորվում է նրանց պաթոգեն ազդեցությունը բարակ աղիների ախտահարմամբ:

Էլեկտրոմետրիկ եղանակով pH չափումները միկրոօրգանիզմների կուլտուրաներում թույլ է տալիս ստանալու օբյեկտիվ քանակական ինֆորմացիանրանց ֆերմենտատիվ ակտիվության մասին, ուստի և մեր կողմից առաջարկվում է միկրոօրգանիզմների բիոբիմիական հատկությունների ուսումնասիրությունը կատարել pH-մետրով, ընդունված որակական տեստերի՝ խայտաբղետ շարքերի փոխարեն:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Tr. Baumgärtel, D. Zahn, Therapie der Gegenw., 96, H. 4, 132—134, (1957). ² В. И. Сазонтов, Л. М. Добролюбов, „Советская медицина“, № 12, 78, 1957. ³ L. Bouisset, J. Breuilland, Rautlin de la Roy, Compt. rend. Soc. biol. 152, n5, 867—870 (1958). РЖБ № 16, 71, 1959. ⁴ V. Lenk, Zbl. Bakteriол. Parasitek. Inf. u. Hyg. Abt. 1, orig. 168, n7—8, 507—508, (1957). ⁵ S. T. Cowan, F. Qrskov, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 8th ed., 1974. ⁶ Проект Международного кодекса номенклатуры бактерий. Пер. с англ. С. Ш. Тер-Казарьяна и С. Л. Пашаряна под ред. и пред. акад. ВАСХНИЛ Я. Р. Коваленко (отв. ред.), проф. В. И. Плотзева, З. Х. Диланяна и Г. А. Шакаряна, Изд. «Айастан», Ереван, 1974. ⁷ Г. П. Калина, в Мис:отом. Руковод. по микробиол. клинике и эпидем. инф. болезней т. 1, Медгиз, М., 1962. ⁸ А. М. Диланян, «Биол. Журн. Армении», т. 29, № 10, 1976. ⁹ Е. В. Гублер, А. А. Генкин, Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях, Изд. «Медицина», Лен. отд., 1975.