



# Трицукровий залізовмісний агар (DM254)

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРОБУ

### Трицукровий залізовмісний агар (DM254)

#### Призначення:

Трицукровий залізовмісний агар (DM254) використовується для диференціації мікроорганізмів, спираючись на їх здатність ферментувати глюкозу, лактозу та цукрозу та виробляти сірководень.

#### Короткий опис та пояснення:

В 1911 році Russell надав опис використання двох цукрів у середовищі для диференціювання грамнегативних організмів з шлунково-кишкового тракту(1). Солі заліза або свинцю були додані до середовища Russell для виявлення наявності сірководню. Kligler додав ацетат свинцю до двцукрового агару Russell та отримав середовище, на якому є можливість диференціювати збудників червоного тифу, паратифу та дизентерії (2,3). Далі модифікація була продовжена, в результаті чого винайшли формулу залізовмісного агару Кліглера з додаванням фенолового червоного у якості індикатора, та солі заліза для виявлення сірководню. У 1940 році Sulkin та Willett дали опис трицукрового середовища з додаванням сульфата заліза для ідентифікації кишкової флори (4). Трицукровий залізовмісний агар фактично є середовищем, чия оригінальна формула запропонували Sulkin та Willett (4). Найна допрацював формулу трицукрового залізовмісного агару, додавши цукрозу до двцукрового агару (з глюкозою та лактозою) за рецептурою залізовмісного агару Кліглера (10). Додавання цукрози підвищило чутливість середовища, що допомагає виявляти бактерії, що ферментують цукрозу, лактозу чи глюкозу. Ферментація вуглеводів виявляється наявністю газу та зміною кольору (від червоного до жовтого) рН індикатора, фенолового червоного. Про наявність сірководню свідчить присутність преципиту чорного кольору у торці пробірки.

Трицукровий залізовмісний агар рекомендований для диференціювання кишкових, грамнегативних бактерій з клінічного матеріалу, зразків молочної продукції та продуктів харчування.

#### Принцип дії:

Ферментативний гідролізат казеїну, пептони тваринного походження, збагачені дріжджовим та м'ясним екстрактами, є джерелом азоту, вуглецю, вітамінів, необхідних для зростання організмів. Трицукровий залізовмісний агар має у своєму складі три цукри (глюкозу, лактозу та цукрозу), феноловий червоний для визначення ферментації вуглеводів, та амонійний сульфат заліза для визначення вироблення сірководню (визначається за наявністю преципиту у пробірці). Ферментація вуглеводів визначається утворенням газу та зміною кольору рН індикатора від червоного до жовтого. З ціллю полегшити визначення організмів, що ферментують глюкозу, концентрація глюкози дорівнює 1/10 від концентрації лактози та цукрози. Невелика кількість кислоти, що виробляється на скосі пробірки під час ферментації глюкози, швидко окислюється і середовище залишається червоного кольору або рН перетворюється на лужне. З іншого боку кисла реакція (жовтий колір) зберігається на дні пробірки, там, куди не потрапляє кисень. Після того, як запаси глюкози вичерпані, мікроорганізми, що ферментують глюкозу, починають переробляти лактозу та цукрозу (11). Для того, щоб підтримувати лужну реакцію на скосі, потрібно забезпечити обіг повітря не щільно прикриваючи пробку пробірки. Якщо закрити пробірку щільно, на скосі з'явиться кисла реакція (виключно за рахунок ферментації глюкози).

#### Формула / Літр

| Інгредієнти                       | Грам/літр |
|-----------------------------------|-----------|
| Пептичний перевар тканин тварини  | 10,00     |
| Ферментативний гідролізат казеїну | 10,00     |
| Дріжджовий екстракт               | 3,00      |
| М'ясний екстракт                  | 3,00      |
| Лактоза                           | 10,00     |
| Цукроза                           | 10,00     |
| Глюкоза                           | 1,00      |
| Хлорид натрію                     | 5,00      |
| Сульфат заліза                    | 0,20      |
| Тіосульфат натрію                 | 0,30      |



## Трицукровий залізовмісний агар (DM254)

|   |           |
|---|-----------|
| Феноловий червоний  | 0,024     |
| Агар  | 12,00     |
| Вирішальне значення рН (при 25°C)   | 7,4 ± 0,2 |
| Формула может змінюватися і/або доповнюватися у відповідності до технічних вимог. |           |

### Засоби застереження:

1. Тільки для лабораторного використання.
2. ПОДРАЖНЮВАЧ. Може подразнювати очі, шкіру та респіраторні органи.

### Приготування:

1. Розчиніть 64,52 г середовища в одному літрі дистильованої води.
2. Нагривайте з частим помішуванням и прокип'ятіть на протязі однієї хвилини до повного розчинення часток.
3. Розлийте по пробірках та стерилізуйте автоклавуванням при 121 °C 1, 1 ат протягом 15 хвилин.
4. Охолодіть у положенні з нахилом щоб сформувалися чіткі скоси.
5. Протестуйте готові середовища на контрольних культурах.

### Контроль якості:

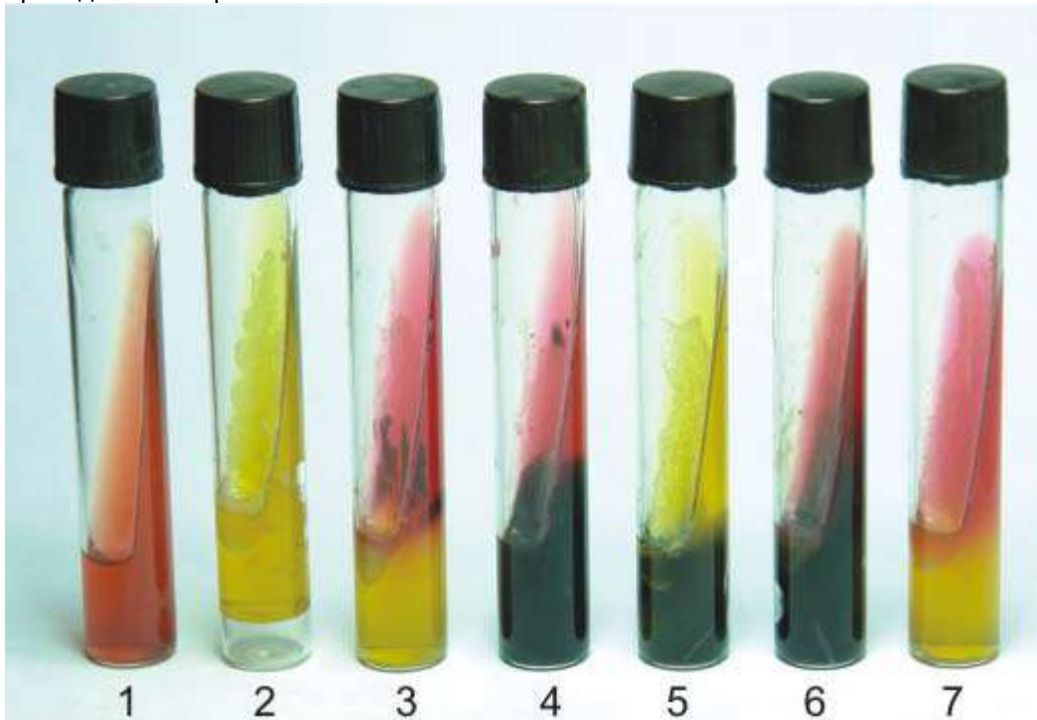
|   |   |
|---|---|
| <b>Зовнішній вигляд сухого середовища</b> | Колір від світлого жовтого до рожевого; гомогенний, легко сипучий порошок         |
| <b>Готове середовище</b>                  | Від рожево червоного прозорого до трохи опалесцюючого гелю у пробірках зі скосами |
| <b>Реакція 6,5% розчину</b>               | рН 7,4 ± 0,2 при температурі 25°C   |
| <b>Міцність гелю</b>                      | Щільний, подібний до 1,2% агарового гелю  |

**Культуральні властивості:** культуральні властивості трицукрового залізовмісного агару відмічаються після інкубації при 35-37°C на протязі 18-24 годин.

| № | Штам мікроорганізмів                        | Інокулят (КУО) | Ріст   | Скіс                               | Стовпчик                         | Газ               | H <sub>2</sub> S потемніння середовища |
|---|---|----------------|--------|------------------------------------|----------------------------------|-------------------|--|
| 1 | <i>Citrobacter freundii</i><br>ATCC 8090    | 50-100         | Пишний | Жовтого кольору<br>Кисла реакція   | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Позитивна реакція | Позитивна реакція                      |
| 2 | <i>Enterobacter aerogenes</i><br>ATCC 13048 | 50-100         | Пишний | Жовтого кольору<br>Кисла реакція   | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Позитивна реакція | Негативна реакція                      |
| 3 | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922       | 50-100         | Пишний | Жовтого кольору<br>Кисла реакція   | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Позитивна реакція | Негативна реакція                      |
| 4 | <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>ATCC 13883  | 50-100         | Пишний | Жовтого кольору<br>Кисла реакція   | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Позитивна реакція | Негативна реакція                      |
| 5 | <i>Proteus vulgaris</i><br>ATCC 6380        | 50-100         | Пишний | Червоного кольору<br>Лужна реакція | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Негативна реакція | Позитивна реакція                      |
| 6 | <i>Salmonella paratyphi A</i><br>ATCC 9150  | 50-100         | Пишний | Червоного кольору<br>Лужна реакція | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Позитивна реакція | Негативна реакція                      |
| 7 | <i>Salmonella typhi</i><br>ATCC 6539        | 50-100         | Пишний | Червоного кольору<br>Лужна реакція | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Негативна реакція | Позитивна реакція                      |
| 8 | <i>Salmonella typhimurium</i><br>ATCC 14028 | 50-100         | Пишний | Червоного кольору<br>Лужна реакція | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Позитивна реакція | Позитивна реакція                      |
| 9 | <i>Shigella flexneri</i><br>ATCC 12022      | 50-100         | Пишний | Червоного кольору                  | Жовтого кольору                  | Негативна реакція | Негативна реакція                      |

|    |  |        |        | Лужна реакція                    | Кисла реакція                    |                   |                   |
|----|--|--------|--------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| 10 | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 8739       | 50-100 | Пишний | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | -                 | Негативна реакція |
| 11 | <i>Escherichia coli</i><br>NCTC 9002       | 50-100 | Пишний | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Позитивна реакція | Негативна реакція |
| 12 | <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>ATCC 10031 | 50-100 | Пишний | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Жовтого кольору<br>Кисла реакція | Позитивна реакція | Негативна реакція |

У таблиці наданій мінімальний перелік штамів мікроорганізмів, що повинні бути використані для проведення контролю якості.



Реакція трицукрового залізовмісного агару

1. Контроль
2. *Escherichia coli* ATCC 25922
3. *Salmonella typhi* ATCC 6539
4. *Proteus vulgaris* ATCC 13315
5. *Citrobacter freundii* ATCC 8090
6. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028
7. *Shigella flexneri* ATCC 12022

### Процедура тестування:

1. Для посіву обережно доторкніться до центру ізолюваної колонії на чашці з середовищем для ентеробактерій холодною, стерильною голкою, проколiть середовище до дна в пробірці, після цього зробіть декілька штрихів по поверхні скосу вперед та назад.
2. Декілька колоній з кожної чашки потрібно вивчати окремо, тому що можливі змішані інфекції.
3. Інкубуйте пробірки з нещільно закритими пробками при температурі 35°C та оцініть ферментацію вуглеводів після 18-24 годин, а також появу газу та сірководню.
4. Можливо спостерігати за комбінацією усіх цих реакцій.
5. Не інкубуйте довше ніж 24 години тому що кисла реакція на скосі у середовищі з лактозою та цукрозою може перетворитися на лужну.
6. Для отримання інформації щодо специфічних процедур зверніться до відповідної літератури по трицукровому залізовмісному агару.

## Результати:

1. Реакція, отримана з невідомої культури повинна бути порівняна з реакцією контрольних штамів.
2. Ферментація вуглеводів фіксується за жовтим забарвленням середовища. Якщо в торці пробірки середовище стає жовтим (кисла реакція), а скіс стає червоним (лужна реакція), мікроорганізм, що тестується ферментує тільки глюкозу.
3. Жовтий колір (кисла реакція) скосу та торцю говорить про те, що мікроорганізм, що тестується ферментує глюкозу, лактозу та/або цукрозу.
4. Червоне (лужна реакція) забарвлення скосу та торцю говорить про те, що мікроорганізм, що тестується, не має можливості ферментувати цукри.
5. Про появу сірководні можна сказати, якщо у торці пробірки з'являється чорний преципітат.
6. Про появу газу свідчить розщеплення та розтріскування середовища.
7. Для фінальної ідентифікації проведіть біохімічні тести та інші тести з чистою культурою мікроорганізму, що тестується. Див. спеціальну літературу для отримання подальшої інформації (12-14).

## Зберігання:

Зберігайте герметично закриту упаковку, що містить сухе середовище при температурі 2 - 30 °С. Після розкривання або перепакування зберігайте флакон в приміщеннях з низьким рівнем вологості при тій же температурі. Бережіть від потрапляння вологи та світла.

## Термін зберігання:

Див термін дії на упаковці. Не використовуйте середовища що втратили сипучість, або якщо зовнішній вигляд відрізняється від оригінального. Термін зберігання відноситься до середовищ за умов збереження цілісності контейнера та при зберіганні відповідно до вказівок.

## Обмеження процедури:

1. Padron and Dockstader (8) винайшли, що не всі  $H_2S$  позитивні *Salmonella* дають позитивні результати на трицукровому залізовмісному агарі.
2. Цукрозу додають до трицукрового залізовмісного агару для того, щоб виділити цукрозо-ферментуючі, але не ферментуючі лактозу бактерії, такі як *Proteus* та *Citrobacter* spp.
3. Не використовуйте петлю для посіву для засіву на трицукровий залізовмісний агар. Під час засіву торцю виникає розтрощення середовища, що може бути розцінене як фальшивий позитивний результат на наявність газу (9).
4. Поява сірководню може спостерігатися на залізовмісному агарі Клігlera, але може бути відсутньою на трицукровому залізовмісному агарі.
5. Вивчення Vulmash and Fulton (7) показали, що використання цукрози може пригнічувати ферментативні механізми, що відповідають за генерацію  $H_2S$ .
6. Цукрозу додають до трицукрового залізовмісного агару для того, щоб виділити цукрозо-ферментуючі, але не ферментуючі лактозу бактерії, такі як *Proteus* та *Citrobacter* spp. (1).
7. Необхідно провести подальші біохімічні та серологічні тести для певної ідентифікації та підтвердження збудника.
8. Не використовуйте петлю для посіву для засіву на трицукровий залізовмісний агар. Під час засіву торцю виникає механічне розтрощення середовища, що може бути розцінене як фальшивий позитивний результат на наявність газу (1).
9. Дуже важливо отримати чисту культуру для засіву на трицукровий залізовмісний агар. В іншому разі можлива невірна інтерпретація результатів.
10. Пробірки потрібно інкубувати з нещільно закритими пробками. Це дозволить обіг повітря, що є необхідною умовою для утворення лужної реакції на скосі (1).

## Упаковка:

Найменування середовища: Трицукровий залізовмісний агар

Каталожний номер: DM254

Доступний розмір упаковки: 100 г / 500 г

## Посилання на літературу:

1. Russell, F. F. 1911. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium. *J. Med. Res.* 25:217.
2. Kligler, I. J. 1917. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group. *Am. J. Public Health* 7:1042-1044.
3. Kligler, I. J. 1918. Modifications of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery, and allied bacilli. *J. Exp. Med.* 28:319-322.



## Трицукровий залізовмісний агар (DM254)

4. Sulkin, S. E., and J. C. Willett. 1940. A triple sugar-ferrous sulfate medium for use in identification of enteric organisms. *J. Lab. Clin. Med.* 25:649- 653.
5. P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.). 1995. *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
6. Marshall, R. T. (ed.). 1992. *Standard methods for the examination of dairy products*, 16th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
7. US Food and Drug Administration. 1995. *Bacteriological analytical manual*, 8th ed. AOAC International, Gaithersburg, M.D.
8. Padron, A. P. and W. B. Dockstader. 1972. Selective medium for hydrogen sulfide production. *Appl. Microbiol.* 23:1107.
9. MacFaddin, J. F. 1985. *Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria*, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
10. Hajna. 1945. *J. Bacteriol.* 49:516.
11. Forbes, Sahm and Weissfeld. 2007. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 12th ed. Mosby, Inc., St. Louis, Mo.
12. Ewing. 1985. *Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae*, 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, N.Y.
13. Holt, Krieg, Sneath, Staley and Williams (ed.). 1994. *Bergey's Manual™ of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Md.
14. Bulmash and Fulton. 1964. *J. Bacteriol.* 88:1813.

### Подальша інформація

Для отримання більш детальної інформації звертайтеся до місцевого представника MICROMASTER.



#### MICROMASTER LABORATORIES PRIVATE LIMITED

DM254PI, Rev.0, 01.08.2008

Unit 38/39, Kalpataru Industrial Estate,

Off G.B. Road, Near 'R-Mall', Thane (W) - 400607. M.S. INDIA.

Ph: +91-22-25895505, 4760, 4681. Cell: 9320126789.

Email: [micromaster@micromasterlab.com](mailto:micromaster@micromasterlab.com)