

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-60-65

УДК 616.98:579.841.93

Ю.С. Ковтун, А.А. Курилова, Л.С. Катунина, Е.И. Василенко

## ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНЦИАНВИОЛЕТА И МАЛАХИТОВОГО ЗЕЛЕННОГО В КАЧЕСТВЕ СЕЛЕКТИВНЫХ АГЕНТОВ ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ БРУЦЕЛЛ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

**Цель работы** – изучение ингибирующего действия генцианвиолета и малахитового зеленого в отношении двух тест-штаммов бруцелл и восьми штаммов микробов-ассоциантов, влияния автоклавирования на их активность; оценка вариабельности селективного действия разных партий красителей, необходимости корректировки концентрации красителей при изготовлении среды для выделения бруцелл. **Материалы и методы.** Использованы по три партии генцианвиолета и малахитового зеленого импортного производства. Ингибиторы вносили в среду культивирования, включающую панкреатические гидролизаты желатина и рыбной муки, дрожжевой экстракт, натрий хлористый, глюкозу, натрий сернистокислый пирро, агар микробиологический. Эту же среду без добавления красителей использовали в качестве контрольной. Действие красителей изучали с помощью тест-штаммов *Brucella abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I, *Enterococcus faecium* VKM B-602, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX 19 222, *Pseudomonas aeruginosa* 22/99, *Serratia plymuthica* 1, *Shigella flexneri* 1a 8516, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* C-187. **Результаты и обсуждение.** Определены показатели прорастания питательных сред, содержащих генцианвиолет в концентрации 5,0; 2,5; 1,25 мг/л, малахитовый зеленый в концентрации 2,0; 1,0; 0,5 мг/л при выращивании бруцелл. Установлено, что генцианвиолет в концентрации 5 мг/л может значительно ингибировать рост бруцелл. Рост *S. aureus* ATCC 25923 отсутствовал на всех средах, содержащих малахитовый зеленый, и средах с генцианвиолетом в концентрациях 5,0 и 2,5 мг/л. Малахитовый зеленый интенсивнее, чем генцианвиолет, ингибировал рост энтерококка, но слабее подавлял «роение» протея. Другие микробы-ассоцианты к действию использованных концентраций красителей были резистентны. Показана необходимость применения красителей в сочетании с другими селективными агентами, а также целесообразность введения генцианвиолета в стерильную среду, а малахитового зеленого – до ее автоклавирования. Концентрацию генцианвиолета при изготовлении питательной среды следует корректировать в связи с выявленными расхождениями ингибирующей активности в разных партиях данного красителя.

**Ключевые слова:** генцианвиолет, малахитовый зеленый, ингибция, селективные агенты, питательная среда, бруцеллы, микробы-ассоцианты.

Корреспондирующий автор: Ковтун Юрий Сергеевич, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Оценка использования генцианвиолета и малахитового зеленого в качестве селективных агентов при выделении бруцелл. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 3:60–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-60-65.

Поступила 06.10.2020. Отправлена на доработку 29.10.2020. Принята к публ. 23.12.2020.

Yu.S. Kovtun, A.A. Kurilova, L.S. Katunina, E.I. Vasilenko

## Assessment of the Use of Gentian Violet and Malachite Green as Selective Agents in the Isolation of Brucella

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the work is to evaluate ability of gentian violet and malachite green to inhibit 2 Brucella test strains and 8 strains of unwanted organisms and the influence of autoclaving on their activity. The study also aims to evaluate variability of inhibition in different batches of colorants and necessity in adjustment of their concentration. **Materials and methods.** The study included 3 imported lots of gentian violet and malachite green. Inhibitors were put into nutrient medium containing pancreatic hydrolysates of gelatin and fish meal, yeast extract, sodium chloride, glucose, sodium pyrosulfate, and agar. The same medium without colorants was used as a control medium. Effect of the colorants was studied with the help of test strains of *Brucella abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I, *Enterococcus faecium* VKM B-602, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX 19 222, *Pseudomonas aeruginosa* 22/99, *Serratia plymuthica* 1, *Shigella flexneri* 1a 8516, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* C-187. **Results and discussion.** We have determined biological parameters of nutrient media containing gentian violet (5,0; 2,5 1,25 mg/L) and malachite green (2,0; 1,0; 0,5 mg/L) when cultivating brucella. Gentian violet is able to inhibit *Brucella* greatly at concentration of 5 mg/L. *S. aureus* ATCC 25923 did not show any growth on the media containing malachite green or gentian violet (5.0 and 2.5 mg/L). Malachite green inhibited the growth of enterococcus more actively than gentian violet. However, it inhibited swarming growth of *Proteus* less successfully than gentian violet. Other unwanted organisms were not sensitive to such concentrations of colorants at all. We have demonstrated the necessity to combine colorants with other selective agents, as well as advisability to put gentian violet into sterile media, while malachite green – into the media before its autoclaving. Adjustments to the concentration of gentian violet should be made when producing nutrient medium, as variations in inhibiting activity in different batches of this colorant were revealed.

**Key words:** gentian violet, malachite green, inhibition, selective agents, nutrient medium, *Brucella*, unwanted organisms.

*Conflict of interest:* The authors declare no conflict of interest.

*Corresponding author:* Yury S. Kovtun, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Citation:* Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Assessment of the use of gentian violet and malachite green as selective agents in the isolation of brucella. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:60–65. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-60-65. Received 06.10.2020. Revised 29.10.2020. Accepted 23.12.2020.

Kovtun Yu.S., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4320-5877>  
Kurilova A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7105-996111>

Katunina L.S., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-8774-101x>  
Vasilenko E.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7580-0991>

Использование красителей в качестве селективных агентов при выделении возбудителей опасных инфекционных болезней предусмотрено рядом нормативно-методических документов.

Так, методическими указаниями МУК 3.1.7.3402-16 «Эпидемиологический надзор и лабораторная диагностика бруцеллеза» и рядом других документов предусмотрено добавление в питательную среду генцианвиолета в концентрации 5 мг/л, однако не приводится описание методики контроля ингибирующих свойств питательных сред. Методическими указаниями МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» регламентируется оценка ингибирующих свойств различных концентраций генцианвиолета, причем как в отношении чумного микроба, так и в отношении микробов-ассоциантов, из чего следует предположение о вариативности селективного действия разных партий красителя. Способы применения коммерческих сред и сред лабораторного изготовления, содержащих генцианвиолет, не предусматривают его введение *ex tempore*, так как предпочтительнее добавление красителей в состав среды до автоклавирования из-за снижения риска контаминации и повышения точности дозирования [1, 2].

В ветеринарной практике в качестве селективного агента для выделения бруцелл, наряду с генцианвиолетом, нашел применение другой трифенилметановый краситель – малахитовый зеленый, в концентрации от 2 до 5 мг/л [3, 4]. L.M. Jones и W.J.B. Morgan при сравнении использования смеси красителей и смеси антибиотиков в качестве селективных агентов среды для выделения бруцелл отмечали, что красители ингибируют рост ряда штаммов бруцелл, требовательных к составу питательного субстрата и условиям культивирования [5]. Однако следует отметить, что в данном исследовании изучалась смесь генцианового фиолетового и малахитового зеленого в концентрациях 4 и 2 мг/л соответственно, которые могли быть чрезмерно высокими. Вместе с тем J. Keness *et al.* удалось выделить *Brucella melitensis* на среде Левенштейна – Йенсена, концентрация малахитового зеленого в которой составляла 250 мг/л [6–8].

Поскольку заболеваемость бруцеллезом стабильно сохраняется на высоком уровне, проблемы диагностики, выделения возбудителя не теряют своей актуальности, и в их совершенствовании существенное значение имеет уточнение ряда практических вопросов, связанных с использованием компонентов современных питательных сред, ин-

гибирующих постороннюю микрофлору, но не подавляющих рост бруцелл [9–11]. В связи с недостаточной освещенностью этого аспекта и отсутствием в доступных источниках сравнительных данных об использовании вышеупомянутых красителей в качестве селективных агентов при выделении бруцелл, были проведены настоящие исследования.

**Цель работы** – изучение ингибирующего действия генцианвиолета и малахитового зеленого в отношении тест-штаммов *Brucella abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I и 8 штаммов микробов-ассоциантов; оценка вариативности селективного действия разных партий красителей и необходимости корректировки концентрации красителей при изготовлении среды для выделения бруцелл, а также изучение влияния автоклавирования на ингибирующую активность генцианвиолета и малахитового зеленого в составе этой среды.

## Материалы и методы

Объектами исследования являлись три партии генцианвиолета (А, В, С) и три партии малахитового зеленого (D, F, E) импортного производства. Ингибиторы вносили в среду культивирования следующего состава (г/л): панкреатические гидролизаты желатина и рыбной муки (из расчета содержания в 1 л среды сухих веществ) – 8,0 и 4,0 соответственно; дрожжевой экстракт – 2,0; натрий хлористый – 5,0; глюкоза – 1,0; натрий сернистоокислый пиро – 0,1; агар микробиологический – 8,0–10,0. Показатель pH среды устанавливали в пределах (7,1±0,1) [12]. Эту же среду без добавления красителей использовали в качестве контрольной.

Селективное действие красителей изучали с помощью тест-штаммов *B. abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I, *Enterococcus faecium* VKM B-602, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* HX 19 222, *Pseudomonas aeruginosa* 22/99, *Serratia plymuthica* 1, *Shigella flexneri* 1a 8516, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* C-187, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и Всероссийской коллекции микроорганизмов. Определение биологических показателей моделей питательных сред проводили в соответствии с методиками, изложенными в МУ 3.3.2.2124-06 и МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Расчетная посевная доза тест-штаммов бруцелл составляла 100 м.к., микробов-ассоциантов – 10000 м.к. на 1 чашку

Петри. Результаты посевов фиксировали в течение 30 дней.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью пакета программ Biostat.

### Результаты и обсуждение

Красители представляли собой мелкодисперсные кристаллические порошки темно-зеленого цвета с металлическим блеском. Генцианвиолет партии А и малахитовый зеленый партии Е содержали темно-зеленые блестящие кристаллообразные включения.

Данные о количестве колоний бруцелл, выросших в течение срока наблюдения на контрольной среде и средах, содержащих разные концентрации трех партий генцианвиолета, представлены в табл. 1. При изучении ингибирующего действия генцианвиолета наблюдалось существенное замедление роста, уменьшение числа и размера вырастающих колоний бруцелл на моделях сред, содержащих краситель партий А и В в концентрации 5 мг/л.

Видимый рост обнаруживался не ранее четвертых суток культивирования, в отдельных случаях появление колоний бруцелл наблюдалось только через 12 суток после посева. На шестые сутки количество колоний *B. abortus* 19 ВА, выросших на среде, включающей данную концентрацию указанных партий генцианвиолета, составляло от 9,8 до 23,5 %, а *B. melitensis* Rev I – от 1,6 до 7,5 % от числа колоний, выросших на третьи сутки инкубации на контрольной питательной среде. Размер колоний обоих штаммов колебался от точечного до среднего (1,5 мм).

К концу срока наблюдения (30 суток) число выросших колоний увеличивалось, однако кратно ( $p < 0,001$ ) уступало количеству колоний, выросших на контрольной среде; на части чашек рост отсутствовал и к этому времени. Была отмечена выраженная неоднородность колоний по размеру: в пределах одной чашки формировались колонии от точечных до колоний диаметром 6 мм. На контрольной среде через 72 ч культивирования вырастало ( $92,31 \pm 3,36$ ) колоний *B. abortus* 19 ВА и ( $95,76 \pm 4,27$ ) колоний

*B. melitensis* Rev I размером 1,5–2,5 мм. Включение в состав среды генцианвиолета партии С в концентрации 5 мг/л приводило к ингибированию роста бруцелл в значительно меньшей степени. Точечные колонии появлялись уже через 48 ч инкубации при температуре 37 °С, их диаметр на третьи сутки достигал около 1 мм, а количество составляло ( $79,16 \pm 4,71$ ) колоний штамма *B. abortus* 19 ВА и ( $47,32 \pm 5,86$ ) колоний штамма *B. melitensis* Rev I. В дальнейшем количество колоний увеличилось незначительно и статистически значимо уступало числу колоний, выросших на среде без ингибитора ( $p < 0,01$ ).

При посеве 100 микробных клеток на среду, содержащую 2,5 мг/л генцианвиолета партий А и В, колонии бруцелл обоих штаммов появлялись на третий – четвертый день, их диаметр на шестой день культивирования колебался от 2,0 до 3,0 мм, а количество варьировало от 58 до 83 % от количества колоний, выросших на контрольной среде, существенно уступало ему ( $p < 0,05$ ) и практически не изменилось до конца срока наблюдения. При концентрации 2,5 мг/л генцианвиолета партии С число колоний бруцелл незначительно уменьшалось ( $p > 0,05$ ), размер их составлял 0,2–0,4 мм через 48 ч и 2,5–3,5 мм через 144 ч (6 суток) культивирования при температуре ( $37 \pm 1$ ) °С.

Введение в среду генцианвиолета в концентрации 1,25 мг/л оказывало умеренное ингибирующее влияние на рост бруцелл. Различия в количестве колоний по сравнению с контрольной средой были недостоверными ( $p > 0,05$ ), отмечалось лишь незначительное уменьшение диаметра колоний на 0,1–0,5 мм в зависимости от продолжительности культивирования.

Из всех взятых в работу микробов-ассоциантов к генцианвиолету в концентрации 5 мг/л чувствительны *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecium* VKM B-602 и *P. vulgaris* HX 19 222. Рост стафилококков при указанном содержании красителя так же, как и при содержании 2,5 мг/л, полностью отсутствовал. Концентрация в среде культивирования 1,25 мг/л генцианвиолета партии А также полностью ингибировала размножение данных микроорганизмов, одна-

Таблица 1 / Table 1

Показатели прорастания питательных сред, содержащих различные концентрации генцианвиолета  
Growth rate (number of CFU/plate) of Brucella strains on culture media with the different concentrations of gentian violet

Наименование тест-штаммов Test strains	Партия генцианвиолета Batch of gentian violet	Количество колоний, выросших при посеве из разведения $10^{-6}$ на среду, содержащую генцианвиолет, в концентрации: The number of colonies grown after sowing from dilution $10^{-6}$ on a medium containing gentian violet at the concentration:			
		5 мг/л 5 mg/l	2,5 мг/л 2,5 mg/l	1,25 мг/л 1,25 mg/l	контроль control
<i>B. abortus</i> 19 ВА	А	25,56±4,97	73,42±4,44	87,32±5,69	92,31±3,36
	В	28,50±6,11	76,68±3,13	91,92±4,51	
	С	82,18±4,63	93,22±5,13	90,73±4,88	
<i>B. melitensis</i> Rev I	А	7,04±3,61	57,60±5,08	92,38±5,46	95,76±4,27
	В	10,75±3,35	64,23±4,80	91,73±4,15	
	С	54,67±5,61	86,71±4,93	92,27±4,96	



ко колонии стафилококков были обнаружены на четвертые – пятые и седьмые – десятые сутки на средах, включающих краситель партий С и В по 1,25 мг/л.

Подавление роста *E. faecium* VKM В-602 в течение срока наблюдения (один месяц) обеспечивала только партия А генцианвиолета при содержании его 5 мг/л. Данная концентрация партии В задерживала видимый рост энтерококков в течение 72 ч. Меньшие концентрации партий А и В красителя, а также партия С во всех трех использованных концентрациях не оказывали заметного ингибирующего действия – рост энтерококков отмечался уже через 24 ч инкубации.

Полного подавления роста *P. vulgaris* НХ 19 222 не обеспечила ни одна партия генцианвиолета ни в одной из изучаемых концентраций – через 24 ч инкубации при температуре (37±1) °С рост наблюдался на всех чашках Петри. В это же время начиналось «роение» на чашках с моделями сред, содержащих 1,25 мг/л всех партий генцианвиолета и содержащих 2,5 мг/л генцианвиолета партии С. Через 48 ч инкубации «роение» наблюдалось на всех засеянных чашках, вместе с тем его интенсивность уменьшалась по мере повышения концентрации генцианвиолета партий А и В, для партии С такой связи не обнаружено – интенсивность «роения» не зависела от количества ингибитора, и даже при концентрации 5 мг/л рост распространялся на 90–95 % поверхности агаровой пластинки. Следует также отметить резкое замедление скорости ползучего роста культуры, начиная с третьих суток инкубации.

Влияние разных концентраций малахитового зеленого на рост бруцелл изучали аналогично, посредством выращивания тест-штаммов *B. abortus* 19 ВА и *B. melitensis* Rev I на контрольной среде и девяти моделях сред, содержащих 0,5, 1 и 2 мг/л красителя трех различных партий, в течение срока наблюдения. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Добавление к среде малахитового зеленого в концентрации 2 мг/л приводило к задержке роста бруцелл, колонии становились видимыми только на четвертые-пятые сутки культивирования. На шестые сутки их размер варьировал от точечных до 0,6 мм,

среднее количество колоний составляло 67–86 % от количества колоний, выросших на контрольной среде, и было достоверно меньшим ( $p<0,05$ ). Контрольная среда через 72 ч инкубации обеспечивала формирование (90,91±4,08) колоний *B. melitensis* Rev I и (96,45±3,38) колоний *B. abortus* 19 ВА диаметром 1,5–2,5 мм.

Уменьшение концентрации малахитового зеленого приводило к увеличению скорости роста, размера вырастающих колоний бруцелл и их количества. На среде, содержащей 1 мг/л красителя, колонии появлялись на третьи – четвертые сутки, 0,5 мг/л – на вторые – третьи сутки культивирования. На шестые сутки их диаметр в первом случае составлял 1,0–2,2 мм, во втором – 1,5–2,7 мм. Количество колоний бруцелл, выросших на данных средах, достоверно не отличалось от числа колоний, выросших на контрольной среде, не содержащей ингибиторов ( $p>0,05$ ).

Все три партии малахитового зеленого подавляли рост золотистого стафилококка во всех изученных концентрациях, а также полностью ингибировали рост *E. faecium* VKM В-602 при содержании красителя 2 и 1 мг/л. Ингибция роста энтерококка при содержании в среде 0,5 мг/л малахитового зеленого была нестабильной: в ряде случаев на вторые-третьи сутки культивирования появлялись колонии данного микроорганизма, которые, по сравнению с колониями бруцелл, были менее выпуклыми, часть имела приподнятый центр и/или зазубренный край.

Не выявлено существенного влияния малахитового зеленого на рост *P. vulgaris* НХ 19 222. На вторые сутки после посева рост и «роение», распространяющееся более чем на 75 % поверхности среды в чашке Петри, наблюдались при использовании всех изученных партий красителя и при всех примененных концентрациях. Отмечено, что на чашках Петри с тонким (менее 3 мм) слоем среды наблюдалось замедление ползучего роста протей.

Другие микробы-ассоцианты, за исключением *S. flexneri* 1a 8516, к действию примененных концентраций малахитового зеленого чувствительными не были. Рост шигелл отсутствовал при концентрации

Таблица 2 / Table 2

Показатели прорастания питательных сред, содержащих различные концентрации малахитового зеленого  
Growth rate (number of CFU/plate) of Brucella strains on culture media with the different concentrations of malachite green

Наименование тест-штаммов Test strains	Партия малахитового зеленого Batch of malachite green	Количество колоний, выросших при посеве из разведения $10^{-6}$ на среду, содержащую малахитовый зеленый, в концентрации: The number of colonies grown after sowing from dilution $10^{-6}$ on a medium containing malachite green at the concentration:			
		2 мг/л 2 mg/l	1 мг/л 1 mg/l	0,5 мг/л 0,5 mg/l	контроль control
<i>B. abortus</i> 19 ВА	D	77,17±6,26	88,32±4,14	94,24±4,53	96,45±3,38
	E	80,26±6,84	88,02±3,40	93,20±3,36	
	F	83,04±4,97	84,67±5,43	85,97±6,94	
<i>B. melitensis</i> Rev I	D	61,77±5,63	84,60±4,68	96,08±5,62	90,91±4,08
	E	68,47±6,17	85,15±4,05	88,50±4,43	
	F	73,68±4,59	91,81±3,96	85,51±5,06	

малахитового зеленого 2 мг/л.

Для изучения влияния на специфическую активность питательных сред стерилизации автоклавированием применяли режим, используемый для большинства употребляемых в практике питательных сред лабораторного изготовления (температура 121 °С, время 20 мин). Содержание в испытуемых средах генцианвиолета составило 2,5 мг/л, малахитового зеленого – 1 мг/л. Указанная концентрация генцианвиолета выбрана вследствие того, что повышение ее вдвое чрезмерно подавляет рост бруцелл, а концентрация малахитового зеленого 2 мг/л не приводит к дополнительному эффекту, половинные же концентрации обоих красителей недостаточно ингибируют постороннюю микрофлору. Данные о количестве колоний бруцелл, выросших при посеве 0,1 мл микробной взвеси из разведения  $10^{-6}$ , и стабильности их основных биологических свойств приведены в табл. 3.

При сравнении количества колоний бруцелл, выросших на испытуемых средах с красителями, добавленными до и после автоклавирования, выявлено, что добавление генцианвиолета в среду до стерилизации приводило к некоторому понижению, а малахитового зеленого – к повышению числа выросших колоний бруцелл относительно числа колоний, полученных при выращивании на средах, в которые красители были внесены после автоклавирования. Однако различия не являлись достоверными ( $p > 0,05$ ).

В случае использования генцианвиолета размер колоний был одинаковым, тогда как при добавлении малахитового зеленого в автоклавированную среду

диаметр вырастающих колоний на 25–30 % уступал диаметру колоний, полученных на питательной среде, в которую этот краситель был введен до стерилизации. Кроме того, при введении малахитового зеленого в среду до стерилизации колонии бруцелл появлялись на 12–24 ч раньше.

Не обнаружено влияние автоклавирования на ингибирующие свойства изученных красителей в отношении микробов-ассоциантов. На всех чашках отсутствовал рост золотистого стафилококка, колонии *E. faecium* VKM B-602 вырастали на всех средах, включающих генцианвиолет, и отсутствовали на средах с малахитовым зеленым, схожими были рост и «роение» протей.

Полученные результаты свидетельствуют, что разные партии генцианвиолета характеризуются неодинаковой ингибирующей активностью, вследствие чего некорректно применение фиксированной концентрации красителя 5 мг/л. Перед изготовлением селективной питательной среды необходимо определять рабочую концентрацию каждой новой партии данного красителя с учетом ее ингибирующей активности как в отношении микробов-ассоциантов, так и в отношении бруцелл.

Ингибирующие свойства трех изученных партий малахитового зеленого различались в меньшей степени, однако для установления возможности исключения проверки ингибирующей активности конкретной партии красителя необходимо накопление большего числа наблюдений.

При изучении влияния автоклавирования на ингибирующие свойства генцианвиолета и малахитового зеленого выявлено, что специфическая актив-

Таблица 3 / Table 3

Влияние автоклавирования на специфическую активность питательных сред, содержащих генцианвиолет и малахитовый зеленый, в отношении тест-штаммов *B. abortus* 19 BA и *B. melitensis* Rev I

Impact of autoclaving on specific activity of nutrient media containing gentian violet and malachite green as regards *B. abortus* 19 BA and *B. melitensis* Rev I test strains

Тест-штаммы Test strains	Наименование показателей Indicators	Наименование красителя Name of the colorant			
		генцианвиолет gentian violet		малахитовый зеленый malachite green	
		добавлен до стерилизации added before sterilization	добавлен после стерилизации added after sterilization	добавлен до стерилизации added before sterilization	добавлен после стерилизации added after sterilization
<i>B. abortus</i> 19 BA	Прорастание, (M±m) % The number of colonies, (M±m) %	72,75±4,19	76,43±3,10	89,12±3,39	85,00±3,70
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний через 144 ч инкубации, морфология, % диссоциации) Stability of basic properties by colony morphology (colony diameter after 144 h of incubation, morphology, % dissociation)	2,0–2,5 мм, S-колонии, 0 2,0–2,5 mm, S-colonies, 0	2,0–2,5 мм, S-колонии, 0 2,0–2,5 mm, S-colonies, 0	1,7–2,3 мм, S-колонии, 0 1,7–2,3 mm, S-colonies, 0	1,3–1,7 мм, S-колонии, 0 1,3–1,7 mm, S-colonies, 0
<i>B. melitensis</i> Rev I	Прорастание, (M±m) % The number of colonies, (M±m) %	60,74±2,91	66,88±2,45	90,12±3,76	85,50±4,14
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний через 144 ч инкубации, морфология, % диссоциации) Stability of basic properties by colony morphology (colony diameter after 144 h of incubation, morphology, % dissociation)	2,0–2,5 мм, S-колонии, 0 2,0–2,5 mm, S-colonies, 0	2,0–2,5 мм, S-колонии, 0 2,0–2,5 mm, S-colonies, 0	1,9–2,5 мм, S-колонии, 0 1,9–2,5 mm, S-colonies, 0	1,3–1,7 мм, S-колонии, 0 1,3–1,7 mm, S-colonies, 0

ность питательных сред существенно не зависела от момента введения красителя – до или после стерилизации, но все же предпочтительнее внесение малахитового зеленого в среду до автоклавирования, а генцианвиолета – в стерильную.

Оба изученных красителя обладают достаточно ограниченным спектром ингибирующего действия на протестированные в рамках работы микробы-ассоцианты, и для удовлетворительного подавления сопутствующей микрофлоры, прежде всего грам-отрицательной, при выделении бруцелл их целесообразно сочетать с селективными агентами, обладающими иной направленностью антимикробного действия. При использовании дополнительных ингибиторов грамотрицательной микрофлоры оптимальнее, по нашему мнению, их комбинация с малахитовым зеленым.

Несмотря на то, что генцианвиолет интенсивнее подавляет ползучий рост протей, малахитовый зеленый имеет ряд преимуществ: его ингибирующее действие на рост бруцелл значительно слабее, при этом есть возможность, не подавляя его, подобрать концентрацию, позволяющую полностью остановить размножение фекальных стрептококков, зачастую присутствующих в исследуемом материале. Кроме того, по сравнению с генцианвиолетом, малахитовый зеленый в гораздо меньшей степени влияет на изменение цветности среды.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

### Список литературы

1. Шепелин А.П., Дятлов И.А. Питательные среды для энтеробактерий. М.: Династия; 2017. С. 76.
2. Подплетенная И.М., Мищенко Д.Н. Модифицированная среда Кесслер для обнаружения бактерий группы кишечной палочки. Патент РФ № 2202618, опубл. 20.04.2003. Бюл. № 11.
3. Васильев Д.А., Щербakov А.А., Карпунина Л.В., Золотухин С.Н. Методы частной бактериологии. Учебно-методическое пособие. Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия; 2004. 222 с.
4. Питательные среды для культивирования бруцелл. [Электронный ресурс]. URL: <https://virus-infekciya.ru/bakterialnye/pitatelnye-sredy-dlya-kultivirovaniya-brucelleza.html> (дата обращения 17.11.2020).
5. Jones L.M., Morgan W.J.B. A preliminary report on a selective medium for the culture of *Brucella*, including fastidious types. *Bull. World Health Organ.* 1958; 19(1):200–3.
6. Keness J., Friedrich I., Banai M., Schonfeld S. *Brucella melitensis* growth on Loewenstein-Jensen egg medium from a case of *Brucella meningitis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 17(4):271–3. DOI: 10.1016/0732-8893(93)90035-6.
7. Friedrich I., Schonfeld S., Keness Y. The ability of *Brucella melitensis* to grow on Loewenstein-Jensen egg medium: presentation of a case with *Brucella meningitis*. *Isr. J. Med. Sci.* 1992; 28(11):806–7.
8. Hornsby R.L. Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. Iowa, Ames: Iowa State University; 1998. [Электронный ресурс]. URL: <https://lib.dr.iastate.edu/rtd/17852> (дата обращения 22.08.2019).
9. Пономаренко Д.Г., Русанова Д.В., Хачатурова А.А., Скударева О.Н., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Семенко О.В., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Анализ эпидемической и эпизоотической ситуации по бруцеллезу в мире в 2019 г. и прогноз на 2020 г. в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (2):48–56. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-48-56.
10. Karagul M.S., Ikiz S. The evaluation of *Brucella* spp. isolation rates in ruminant abortion cases by using different selective media. *Mac. Vet. Rev.* 2018; 41(2):177–86. DOI: 10.2478/macvetrev-2018-0024.
11. Vicente A.F., Antunes J.M.A.P., Lara G.H.B., Mioni M.S.R., Allendorf S.D., Peres M.G., Appolinário C.M., Listoni F.J.P., Ribeiro M.G., Megid J. Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. *BioMed. Res. Int.* 2014; 2014:702072. DOI: 10.1155/2014/702072.
12. Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. [Comparative evaluation of protein hydrolysates in the process of constructing based on them nutrient medium for brucella cultivation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):93–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-93-97.

### References

1. Shepelin A.P., Dyatlov I.A. [Nutrient Media for Enterobacteria]. Moscow: Publishing house "Dynasty"; 2017. 76 p.
2. Podpletennaya I.M., Mishchenko D.N. [Modified Kessler medium for the detection of *E. coli* bacteria]. RF patent No. 2202618, publ. 20.04.2003. Bul. No. 11.
3. Vasil'ev D.A., Shcherbakov A.A., Karpunina L.V., Zolotukhin S.N. [Special Bacteriology Methods. Study Guide]. Ulyanovsk: Ulyanovsk State Agricultural Academy; 2004. 222 p.
4. [Nutrient media for the cultivation of brucellosis]. (Cited 17 Nov 2020). [Internet]. Available from: <https://virus-infekciya.ru/bakterialnye/pitatelnye-sredy-dlya-kultivirovaniya-brucelleza.html>.
5. Jones L.M., Morgan W.J.B. A preliminary report on a selective medium for the culture of *Brucella*, including fastidious types. *Bull. World Health Organ.* 1958; 19(1):200–3.
6. Keness J., Friedrich I., Banai M., Schonfeld S. *Brucella melitensis* growth on Loewenstein-Jensen egg medium from a case of *Brucella meningitis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 1993; 17(4):271–3. DOI: 10.1016/0732-8893(93)90035-6.
7. Friedrich I., Schonfeld S., Keness Y. The ability of *Brucella melitensis* to grow on Loewenstein-Jensen egg medium: presentation of a case with *Brucella meningitis*. *Isr. J. Med. Sci.* 1992; 28(11):806–7.
8. Hornsby R.L. Selective media for isolation of *Brucella abortus* strain RB51. Iowa, Ames: Iowa State University; 1998. (Cited 22 Aug 2019) [Internet]. Available from: <https://lib.dr.iastate.edu/rtd/17852>.
9. Ponomarenko D.G., Rusanova D.V., Khachaturova A.A., Skudareva O.N., Logvinenko O.V., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Semenko O.V., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. [Analysis of the epidemic and epizootic situation on brucellosis around the world in 2019 and the forecast for the Russian Federation for 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):48–56. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-48-56.
10. Karagul M.S., Ikiz S. The evaluation of *Brucella* spp. isolation rates in ruminant abortion cases by using different selective media. *Mac. Vet. Rev.* 2018; 41(2):177–86. DOI: 10.2478/macvetrev-2018-0024.
11. Vicente A.F., Antunes J.M.A.P., Lara G.H.B., Mioni M.S.R., Allendorf S.D., Peres M.G., Appolinário C.M., Listoni F.J.P., Ribeiro M.G., Megid J. Evaluation of three formulations of culture media for isolation of *Brucella* spp. regarding their ability to inhibit the growth of contaminating organisms. *BioMed. Res. Int.* 2014; 2014:702072. DOI: 10.1155/2014/702072.
12. Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. [Comparative evaluation of protein hydrolysates in the process of constructing based on them nutrient medium for brucella cultivation]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (4):93–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-93-97.

### Authors:

Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

### Об авторах:

Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.