

На правах рукописи

КРАВЧЕНКО Ольга Сергеевна

**БАКТЕРИИ РОДА *ENTEROCOCCUS* В ОЗЕРЕ БАЙКАЛ:
РАСПРЕДЕЛЕНИЕ, ВИДОВОЙ СОСТАВ, МЕХАНИЗМ АДАПТАЦИИ**

03.00.16 – экология
03.00.07 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Улан-Удэ, 2009

Работа выполнена в лаборатории водной микробиологии Лимнологического института СО РАН, г. Иркутск

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
ст.н.с., Парфенова Валентина Владимировна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Намсараев Баир Бадмабазарович

доктор медицинских наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ
Савилов Евгений Дмитриевич

Ведущая организация: Учреждение Российской Академии Медицинских Наук,
НИИ эпидемиологии и микробиологии Сибирского Отделения РАМН,
Владивосток

Защита состоится «14» мая 2009 г. в 10 часов на заседании Диссертационного совета Д.212.022.03 при Бурятском государственном университете по адресу: 670000, г. Улан-Удэ, ул. Смолина, 24 а, биолого-географический факультет, конференц-зал. Факс: (3012)21-05-88, e-mail: d21202203@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Бурятского государственного университета.

Автореферат разослан «13» апреля 2009 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Н. А. Шорноева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Систематические исследования бактерий рода *Enterococcus*, относящихся к индикаторной потенциально-патогенной группе микроорганизмов, входящие в перечень показателей качества вод, в озере Байкал ранее не проводились. В течение многих лет микроорганизмы этого рода рассматривали как клинически малозначимые. Пересмотр оценки патогенетической роли энтерококков способствовало обнаружение у микроорганизмов факторов вирулентности. В последние годы роль микроорганизмов, относящихся к роду *Enterococcus*, возросла не столько из-за их широкого распространения, сколько из-за приобретения ими устойчивости к подавляющему большинству доступных антибактериальных препаратов, к высушиванию, свету, низкой температуре, а также к действию физических, химических и биологических факторов (The Enterococci..., 2002).

Кроме того, согласно многочисленным исследованиям, патогенные и непатогенные микроорганизмы способны переходить в некультивируемое состояние («viable but nonculturable state» (VBNC)), при котором клетки на питательной среде колоний не образуют, но при этом остаются жизнеспособными (Kell et. al., 1998; Oliver, 2005). Возможно, этот механизм позволяет сохраняться в воде Байкала различным группам микроорганизмов, в том числе и потенциально-патогенным. Изучение возможного постоянного поступления потенциально-патогенных бактерий в озеро и сохранения ими своей жизнеспособности в воде в комплексе с другими группами микроорганизмов очень важно, прежде всего, с точки зрения оценки качества байкальской воды.

Цель исследования: изучение особенностей распространения и видового состава бактерий рода *Enterococcus* в различных районах озера Байкал, установление механизма адаптации энтерококков, позволяющего длительное время сохранять жизнеспособное состояние в особых экологических условиях озера.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи:**

1. исследовать количественное распределение бактерий группы *Enterococcus* в воде озера Байкал, его основных притоках и в реке Ангаре;
2. определить видовой состав микроорганизмов рода *Enterococcus*, выделенных из воды озера Байкал;
3. изучить гемолитическую активность и антибиотикорезистентность бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из воды озера Байкал;
4. в лабораторных условиях установить один из возможных механизмов выживания бактерий рода *Enterococcus* в байкальской воде;
5. провести модельные эксперименты по влиянию химических и физических факторов на выживание бактерий рода *Enterococcus* в воде озера Байкал.

Научная новизна. Впервые исследовано количественное распределение и видовой состав бактерий рода *Enterococcus* в различных районах озера Байкал, в его основных притоках и в реке Ангаре. Установлены видовой состав энтерококков, выделенных из акватории озера Байкал, и факторы их

патогенности. Впервые в экспериментальных условиях на примере бактерий рода *Enterococcus* рассмотрены адаптационные возможности выживания грамположительных бактерий в особых экологических условиях Байкала в результате перехода их в некультивируемое состояние. Выяснено, что сохранение жизнеспособности связано с изменением структуры клеточной стенки. Проведены экспериментальные работы по изучению влияния используемых методов дезинфекции на рост и развитие бактерий рода *Enterococcus*.

Практическая значимость. Полученные данные о распределении и видовом составе бактерий рода *Enterococcus* являются индикаторами антропогенного влияния на озеро Байкал и могут быть использованы в качестве дополнительных показателей при организации комплексного микробиологического мониторинга. Показано, что антибиотикорезистентность и гемолитическая активность бактерий рода *Enterococcus* могут служить дополнительными критериями патогенности водных бактерий, которые необходимо учитывать при оценке качества воды озера Байкал. Сформированная коллекция культур бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из различных районов озера Байкал, может быть использована при оценке эффективности процессов дезинфекции, что особенно важно при подготовке питьевой воды, которая должна использоваться с учетом ее безопасности для потребителей.

Защищаемые положения:

1. В озере Байкал бактерии рода *Enterococcus* приурочены к литоральным районам озера, прилегающим к населенным пунктам, и его основным притокам. Изолированные штаммы фекального происхождения *E. faecium*, *E. avium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum* могут рассматриваться как специфические индикаторы санитарно-бактериологического состояния качества воды.

2. Адаптация и сохранение жизнеспособности бактерий рода *Enterococcus* в байкальской воде обусловлены переходом их в некультивируемое, но жизнеспособное состояние за счет изменения структуры клеточной стенки.

3. Устойчивость бактерий рода *Enterococcus* к воздействию хлора и озона повышается в присутствии органических веществ, что необходимо учитывать при водоподготовке питьевой воды.

Апробация работы и публикации. Результаты работы были представлены на следующих конференциях и симпозиумах: Всероссийской конференции «Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии» (Улан-Удэ, 2006); II Международной молодежной школе-конференции «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2006); Международной молодежной научно-методической конференции «Проблемы молекулярной и клеточной биологии» (Томск, 2007); II Международном Байкальском Микробиологическом симпозиуме «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водохранилищ» (Иркутск - п. Листвянка, 2007); III Международной конференции молодых ученых «Биоразнообразие. Экология. Адаптация. Эволюция» (Одесса, 2007); итоговой конференции по результатам выполнения

мероприятий за 2007 г. в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно–технологического комплекса России на 2007 – 2012 годы» (Москва, 2007); Международном симпозиуме «Контроль и реабилитация окружающей среды: КРОС – 2008» (Томск, 2008); Всероссийской научно-практической конференции «Человек: здоровье и экология» (Иркутск, 2008); International Symposium (Australia, 2008); IV Молодежной школе-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2008); итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2008 г. в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно–технологического комплекса России на 2007 – 2012 годы» (Москва, 2008). По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 3 статьи опубликованы, 2 – приняты в печать, 11 тезисов и получено одно свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2009620013.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзорного анализа литературы, трех глав, изложенных на основании собственных исследований, заключения, выводов, списка использованной литературы (152 источника, из них 97 – зарубежных) и приложений. Объем работы составляет 143 страницы машинописного текста, включающего 12 таблиц, 32 рисунка и 2 приложения.

Автор выражает благодарность и искреннюю признательность научному руководителю, зав. лабораторией, к.б.н. Парфеновой В. В. за постановку задач и помощь в проводимых исследованиях, а также Павловой О. Н., Захаровой Ю. Р., Косторновой Т. Я., Суловой М. Ю., Бедашвили Е., Фикель Я., Обст У. и всем сотрудникам лаборатории водной микробиологии ЛИН СО РАН за оказанную помощь при выполнении работ и обсуждении результатов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. Обзор литературы

Приведены литературные данные по таксономии и физиолого-биохимической характеристике бактерий рода *Enterococcus*. Рассмотрены антибиотикорезистентность, гемолитические свойства и клиническое значение исследуемых бактерий, а также механизмы адаптации и выживания энтерококков в низкотемпературных условиях среды. Обсуждается роль представителей рода *Enterococcus* в оценке качества воды.

ГЛАВА 2. Объекты и методы исследования

За весь период исследования с 2005 по 2008 гг. было отобрано и проанализировано 500 проб воды на 61 станции озера Байкал. В чистую культуру было выделено 306 штаммов микроорганизмов, отнесенных к роду *Enterococcus*, для 120 штаммов определен видовой состав,

антибиотикорезистентность и гемолитическая активность. Нами проведено 35 серий экспериментов.

Объектами данного исследования являются озеро Байкал, его основные притоки и река Ангара. Пробы воды отбирали в 2005 - 2008 гг. в стерильные флаконы батометром и обрабатывали по общепринятым методикам (Романенко, 1974). Распределение, численность, видовой состав бактерий рода *Enterococcus* были изучены в поверхностных и глубинных слоях воды, взятых на станциях стандартных центральных гидрологических разрезов в Южном, Среднем и Северном Байкале, а также в устьях рек (рис. 1).

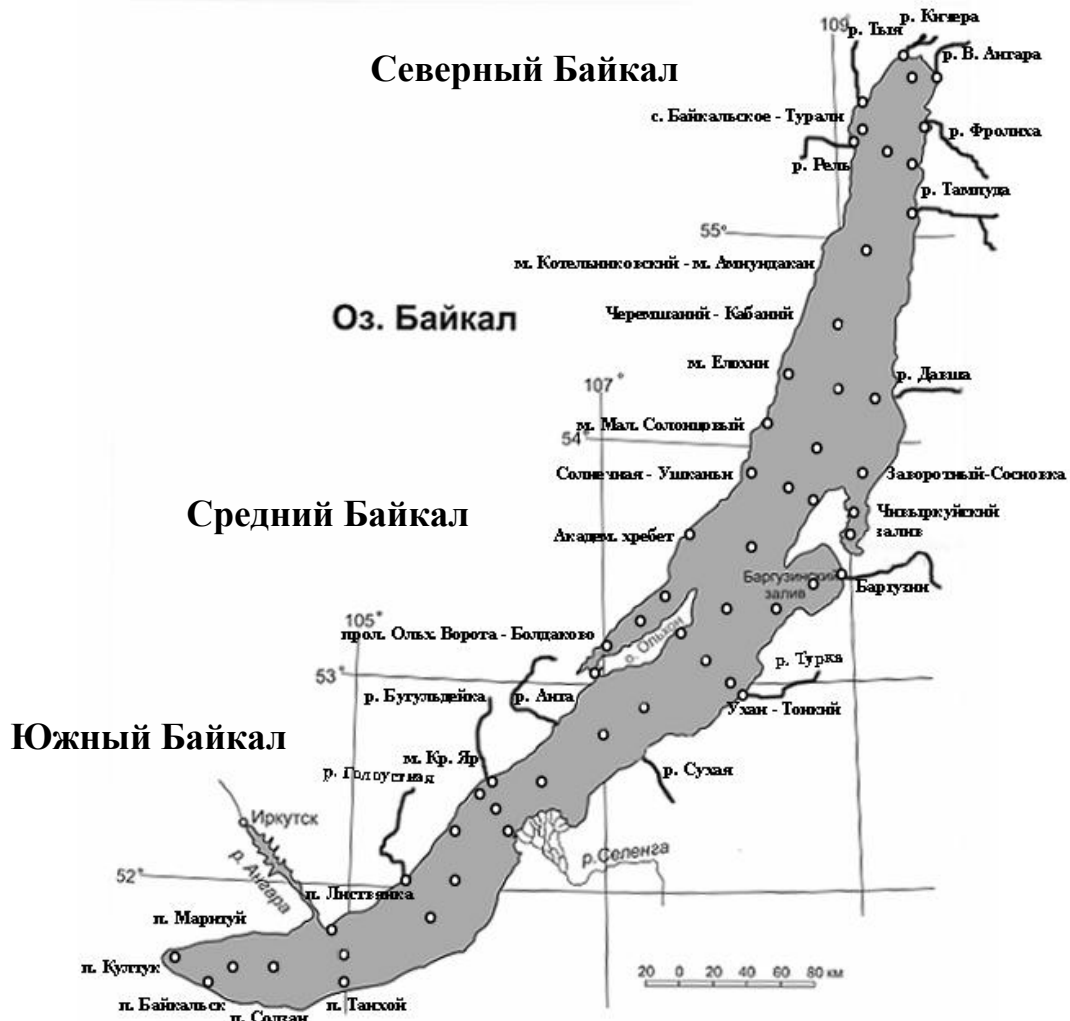


Рис. 1. Карта-схема станций отбора проб воды:
○ – точки отбора проб

Для выделения колоний из водных образцов и учёта численности бактерий рода *Enterococcus* использовали метод посева на бактериальных фильтрах. Объем воды (50 мл) пропускали через фильтр, который помещали на селективную среду Сланца-Бертли. Инкубацию посевов проводили при 37°C в течение 48 ч. (Санитарно-микробиологический..., 2005). Для уточнения результата фильтр с выросшими колониями переносили на среду, содержащую желчь, эскулин и железо (III) лимонноаммиачное. Посевы на данной среде инкубировали при 44°C в течении двух часов. Образование черного пигмента,

диффундирующего в среду, свидетельствует о положительном результате при определении бактерий рода *Enterococcus* в воде (EN ISO 7899-2: 2000).

Для обнаружения в пробах воды бактерий рода *Enterococcus* применяли молекулярно-биологический метод (ПЦР-анализ) с родо-специфическими праймерами.

Видовую идентификацию культур проводили по морфологическим и физиолого-биохимическим свойствам в соответствии с современными принципами классификации (Manero et. al., 1999). Для этого определяли следующие признаки: посев на косяки для получения суточной культуры и окраска по Грамму, наличие у чистых культур микроорганизмов сахаролитической и каталазной активностей, способность к редукции теллурита калия, к гидролизу аргенина и эскулина, способность роста при 45°C, при 50°C, а также определение их гемолитической активности (Определитель бактерий Берджи, 1997; Manero et. al., 1999; Справочник по микробиологическим..., 1967).

Антибиотикорезистентность изолированных штаммов определялась диско-диффузионным методом, на среде Мюллера-Хинтона, с использованием восьми антибиотиков: стрептомицин, тетрациклин, ванкомицин, бензилпенициллин, ципрофлоксацин, эритромицин, гентамицин, рифампицин. Анализ материала проведен по трем группам: чувствительные, промежуточные и устойчивые (Определение чувствительности..., 2004).

Изучение адаптационных механизмов роста и развития энтерококков в байкальской воде проводили в лимитируемых условиях с лабораторными культурами *E. faecium*, выделенными из разных районов озера Байкал. Первый штамм, Ent. 8, был выделен в 2005 г. из вод озера Байкал у поселка Култук, а второй, S 11 - в 2006 г. из протоки Галута устья реки Селенги. В колбы с нестерильной байкальской водой объемом 100 мл вносили посевной материал. Далее по контрольным посевам определяли кривые развития бактерий при разных температурных условиях: 4°C, 20°C, 37°C. Изучения морфологии и изменений внутриклеточной структуры энтерококков проводились методом трансмиссионной и сканирующей микроскопии.

Для изучения влияния химических факторов на выживание энтерококков проводили эксперименты при действии гипохлорита кальция. Эксперимент был проведен в байкальской воде со штаммом *E. faecium* при наличии и без питательного вещества. В колбы с байкальской водой объемом 100 мл вносили посевной материал и различное количество гипохлорита кальция. Для определения количественного содержания и характера развития бактерий в колбах отбирали аликвоты воды по 1 мл, которые высевали на селективный эскулиновый агар с азидом и канамицином и культивировали в течение суток при 37°C.

Для изучения влияния физических факторов на выживание энтерококков в воде озера Байкал в экспериментальных условиях использовали штамм *E. faecium*. В колбы с озонированной байкальской водой объемом 100 мл вносили посевной материал. Эксперимент проводили в байкальской воде без добавления

и при добавлении питательного вещества. Озонирование байкальской воды проводилось на предприятии по производству бутылированной воды ООО «Вода Байкала» на инжекторной системе Вэнтури, компании Olmsted Ozone, Германия. Количество начального и остаточного озона в колбах проверяли прибором OAKTON Instruments (USA).

Статистическая обработка данных была проведена по стандартным методикам (Рождественский и др., 1974), с использованием программного пакета Microsoft Excel 7.0 для Windows 98. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Для полученных данных рассчитывали среднее значение, среднее квадратичное отклонение. Выводы сделаны с учетом уровня значимости $\alpha = 0,05$.

ГЛАВА 3. Распределение бактерий рода *Enterococcus* в различных районах озера Байкал, его основных притоках и в реке Ангаре

Проведенные в 2005 г. исследования распределения энтерококков в оз. Байкал показали, что в акватории озера имеются локальные участки, где наблюдается повышенное содержание этих бактерий. Заметное количество представителей рода *Enterococcus* выявлено в пробах воды, отобранных у пос. Култук, в районе влияния БЦБК, в устье реки Баргузин. В пробах, отобранных на контрольных станциях и во всех глубоководных районах озера, энтерококки методами культивирования обнаружены не были. В исследованиях воды были использованы также молекулярно-биологические методы, которые оказались более чувствительными при определении этой группы микроорганизмов. Бактерии рода *Enterococcus* молекулярно-биологическими методами были выявлены не только в местах поступления речных вод, но и в пробах воды открытого Байкала, взятых с поверхности на контрольных пунктах. В пелагиали озера, в пробах, отобранных в глубинных слоях, изучаемая группа бактерий не выявлялась даже при применении разнообразных методик выделения. Дополнительные исследования в воде озера, были проведены в 2007 г. и 2008 г. Наибольшие значения численности энтерококков отмечены в пробах воды, отобранных непосредственно в реках, таких как Фролиха, Голоустная, Баргузин, Сарма, Рель, Тья, Томпуда, Сухая и Бугульдейка.

Детальные исследования были проведены в Южном Байкале и показали, что вода исследуемого района загрязнена энтерококками в той или иной степени. По результатам, полученным за исследуемые периоды, бактерии рода *Enterococcus* были обнаружены в 30 пробах из 105 в 2006 г. и в 30 пробах из 126 в 2007 г., что составляет 29% и 24% соответственно.

Основное внимание при изучении распределения потенциально-патогенной группы *Enterococcus* было направлено на их распространение в водной толще дельты реки Селенги как района с высокой антропогенной нагрузкой на озеро. Были проведены подробные исследования этого района в 2006 г. и 2008 г. Высокие значения численности исследуемых бактерий были установлены в самой дельте реки, которая отличается наиболее благоприятными условиями для прогрева вод, накопления и трансформации

органического вещества и, как следствие, развития микроорганизмов. Чем дальше от дельты в озеро, тем меньше исследуемых микроорганизмов обнаруживали в пробах воды. Это говорит о том, что даже отрицательное влияние реки Селенги компенсируется особыми условиями Байкала.

В августе 2006 г. были проведены исследования по обнаружению бактерий рода *Enterococcus* в р. Ангаре - ниже Усть-Илимской ГЭС и до места впадения реки в Енисей. Бактерии рода *Enterococcus* встречались в верховой части этого отрезка реки, где она испытывает влияние сточных вод Усть-Илимского лесопромышленного комплекса (УИЛПК), а также возле небольших населенных пунктов. Увеличение численности микроорганизмов далее вниз по реке обусловлено поступлением органических веществ и биогенных элементов с водосборной площади.

Таким образом, наличие санитарно-показательных бактерий рода *Enterococcus* является важным показателем антропогенного воздействия на р. Ангару, оз. Байкал и его притоки.

За период исследований из байкальской воды было выделено 306 штаммов, отнесенных к роду *Enterococcus*, 120 из которых были идентифицированы до вида.

E. faecalis, который наиболее часто встречается у человека и «ответственен» за 80 – 90% энтерококковых инфекций, составляет 20% в пробах, отобранных в Южном и 12% в Среднем Байкале, и 22% в пробах воды, отобранных в Северном Байкале. В данных районах доминирует *E. faecium* 47%–26%–45% соответственно (рис. 2).

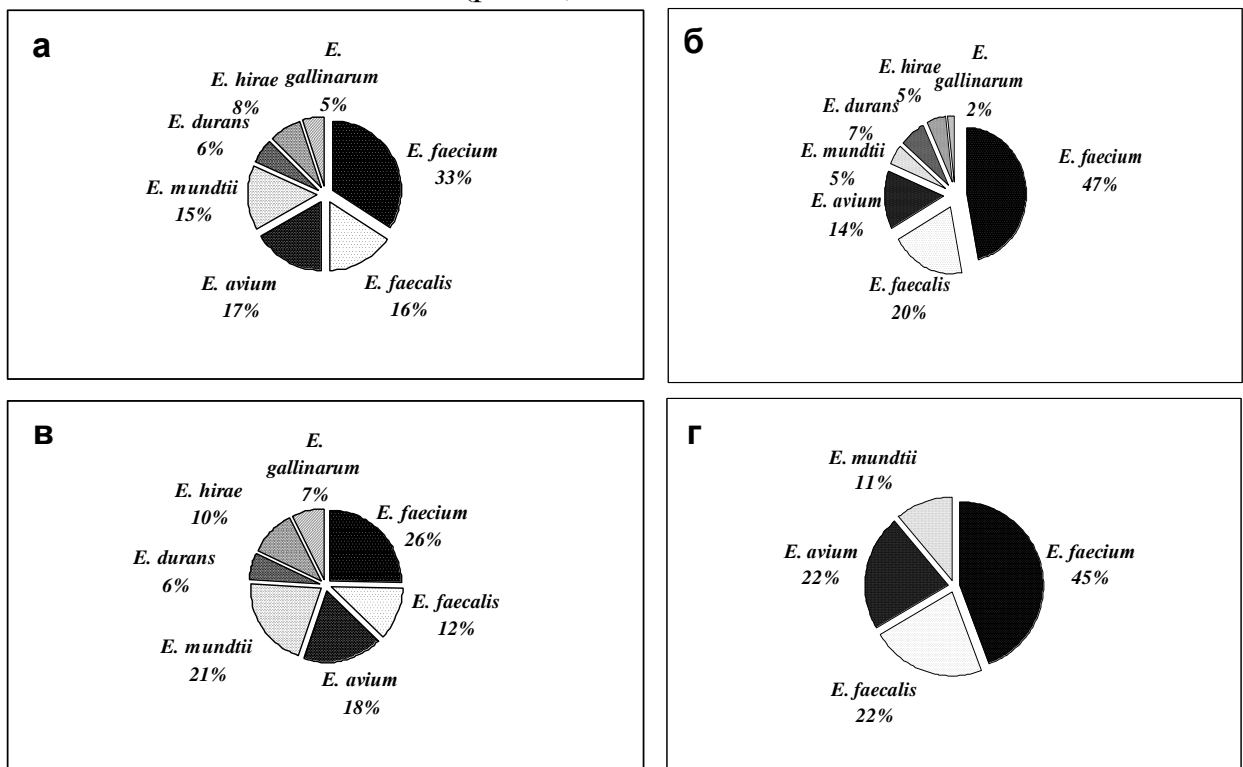


Рис. 2. Соотношение видов бактерий р. *Enterococcus*, изолированных из проб воды оз. Байкал в целом (а), Южного (б), Среднего (в), Северного Байкала (г)

В последние годы для *E. faecium*, вызывающего 10 – 15% энтерококковых инфекций, отмечается повышение частоты нозокомиального носительства, связанного, по-видимому, с большей его резистентностью ко многим антибактериальным препаратам (Gordts et al., 1995; Padiglione et al., 2000; Дехнич и др., 2001).

Из исследуемых районов изолированы также штаммы: *E. faecium*, *E. avium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum*. В основном это виды фекального происхождения, и в большинстве случаев они могут рассматриваться как специфические индикаторы загрязнения воды фекалиями человека, животных и птиц. Наибольшим разнообразием видов характеризуются пробы воды, отобранные в Южном и Среднем Байкале. В данных районах представлены семь видов, в отличие от проб Северного Байкала, где обнаружено четыре (рис. 2).

ГЛАВА 4. Гемолитическая активность и антибиотикоустойчивость бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из озера Байкал

Свойства гемолитической активности у бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из озера Байкал, ранее не изучались. На наличие гемолитической активности было протестировано 120 штаммов энтерококков, выделенных из озера Байкал.

В результате проведенных исследований было выяснено, что всего 4% от общего числа проанализированных штаммов энтерококков обладали гемолитической активностью. Гемолитическую активность проявляли культуры, выделенные из проб воды, отобранных в районе п. Култук (Южный Байкал), а также из литоральных областей Среднего Байкала, а именно, районов реки Сухая и реки Селенги. Важно отметить, что ни один штамм бактерий, выделенных из проб северного района озера, не обладал гемолитической активностью, что говорит о наименьшем антропогенном воздействии на этот район.

Проведенные эксперименты по определению антибиотикорезистентности характеризуют данные микроорганизмы как антибиотикочувствительные. Так, из 120 изолированных культур высокой чувствительностью характеризовались микроорганизмы по отношению к гентамицину (95% штаммов), ванкомицину (87%) и тетрациклину (79%) (рис. 3). Промежуточным уровнем резистентности характеризовались микроорганизмы по отношению к эритромицину (55%) и ципрофлоксацину (36%). Выделенные культуры обладали наибольшей резистентностью к рифампицину (30%), стрептомицину (28%) и бензилпеницилину (22%) (рис. 3).

По результатам исследования, *E. faecium* – вид, который наиболее часто встречается среди изолированных штаммов энтерококков, характеризовался в целом как антибиотикочувствительный.

Необходимо отметить тот факт, что из всей исследуемой коллекции выделено 20 штаммов, для которых характерен промежуточный уровень устойчивости к ванкомицину. Следует сказать, что согласно проведенным исследованиям антибиотикочувствительности энтерококков в России

клинических штаммов, резистентных к ванкомицину и тейкопланину, не обнаружено (Сидоренко и др., 1998; Тюрин и др., 2000; Мироненко и др., 2007).

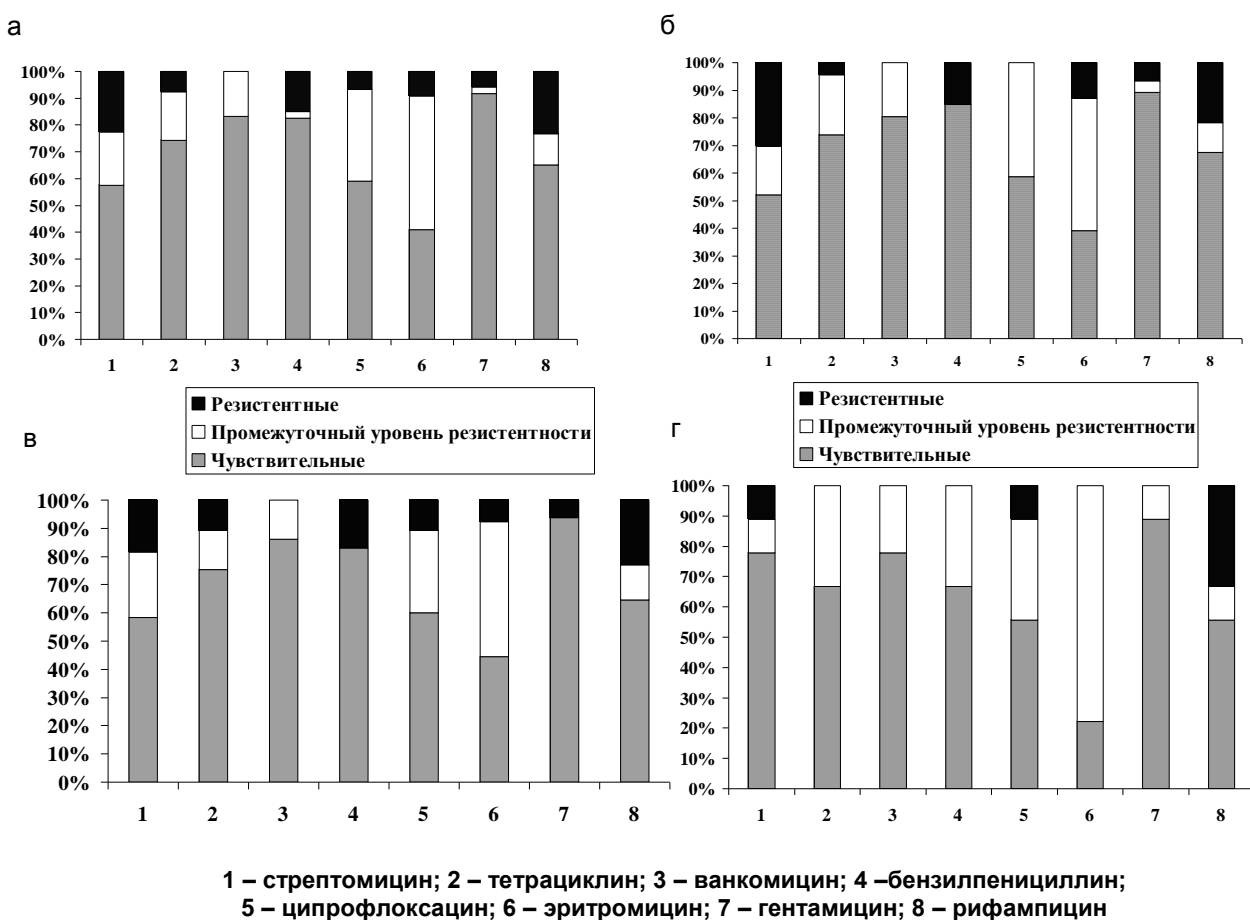


Рис. 3. Суммарная чувствительность бактерий рода *Enterococcus* к антибиотикам, изолированных из озера Байкал в целом (а), Южного (б), Среднего (в), Северного Байкала (г)

ГЛАВА 5. Изучение выживаемости и адаптации условно-патогенных бактерий рода *Enterococcus* в условиях лабораторного моделирования

Исследования способности выживания энтерококков в окружающей среде представляют наибольший интерес в свете проблем сохранения чистоты природных вод и использования их в качестве питьевой воды без нанесения ущерба здоровью потребителей. На основе анализа литературных данных и проведенных собственных исследований было сделано предположение, что обнаружение энтерококков в воде молекулярно-биологическими методами, а не методами культивирования, связано с переходом их в некультивируемое, но жизнеспособное состояние. Многие бактерии могут входить в VBNC состояние при неблагоприятных условиях окружающей среды (Barer et. al., 1993; Oliver 1993; Satta et. al., 1994).

В байкальской воде энтерококки встречаются как с условиями низкой температуры, так и с условиями низких концентраций питательных веществ. Поэтому наибольший интерес представляет изучение сочетания действия

основных абиотических факторов – температурного и трофического на самый распространенный в воде озера вид – *Enterococcus faecium*.

На рис. 4 а видно, что клетки штамма Ent. 8 на 12 сутки перестают культивироваться в байкальской воде при 4°C и 24°C, но при добавлении питательных веществ бактерии вновь переходили из некультивируемого состояния в культивируемое. Исключение составили бактерии, культивируемые при 37°C, где сразу шло снижение численности клеток и, в конце концов, наступала их гибель. Это можно объяснить тем, что штамм Ent. 8, выделенный из озера Байкал, приспособлен к низким положительным температурам озера, а 37°C является экстремальным для его развития.

При исследовании культивирования штамма S 11 были получены данные, представленные на рис. 4. б, которые показали, что для штамма, выделенного из реки Селенги, температура 37°C не является критической, но при этой температуре энтерококки без увеличения численности быстрее впадают в некультивируемое, но жизнеспособное состояние. Вероятно, это связано с тем, что вода в реке прогревается до более высоких температур, чем в самом озере, и поэтому клетки штамма S 11 легче адаптируются к разным температурным условиям. При культивировании штамма S 11 при 4°C и 24°C результаты оказались такими же, как при культивировании штамма Ent. 8 при тех же температурах. В этих условиях энтерококки культивировались гораздо более длительный период времени, чем при температуре 37°C, и с понижением температуры увеличивалась выживаемость энтерококков, что находит подтверждение в литературе (Алтон, 1980; Филимонова, 1983; Bunker et al., 2004). При добавлении питания клетки вновь переходили в стадию культивированного состояния.

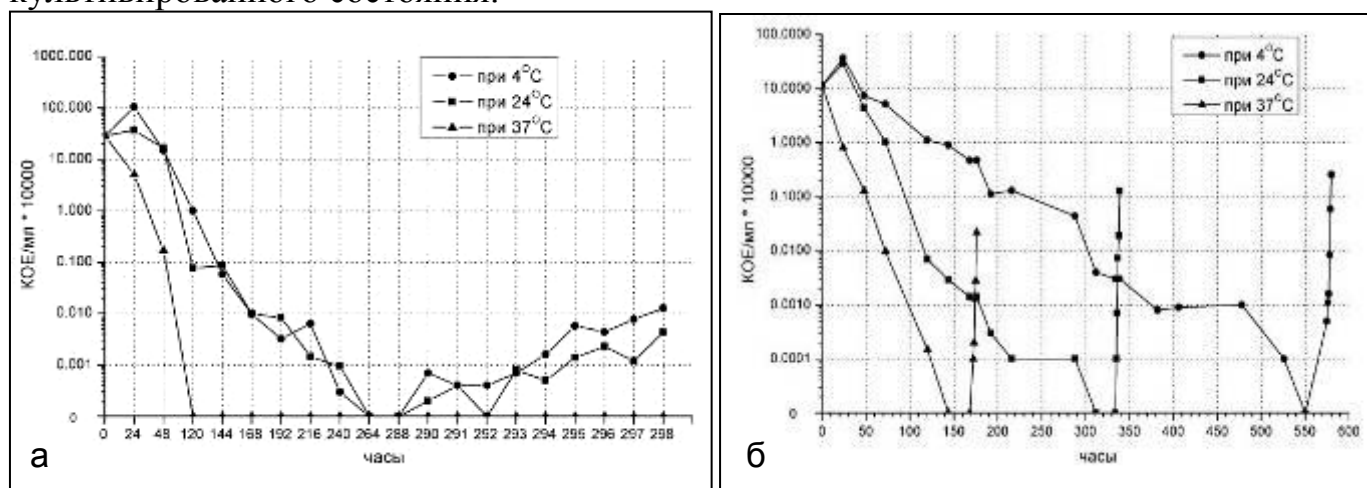


Рис. 4. а – Культивирование Ent. 8 в байкальской воде при разных температурах; б – культивирование S 11 в байкальской воде при разных температурах

Дальнейшие исследования некультивируемого, но жизнеспособного состояния при помощи электронной микроскопии показали, что происходят изменения размеров клетки и ее клеточной стенки (рис. 5). Это, по-видимому, способствует выживанию исследуемых бактерий, как при низких

температурных условиях, так и недостаточном для их жизнедеятельности количестве органического вещества. Клетки при выходе из жизнеспособного, но некультивируемого состояния, «скидывают» верхний слой клеточной оболочки (рис. 6 б - д) и в дальнейшем эти же клетки вполне жизнеспособны и после адаптационного периода способны к размножению (рис. 6 е).

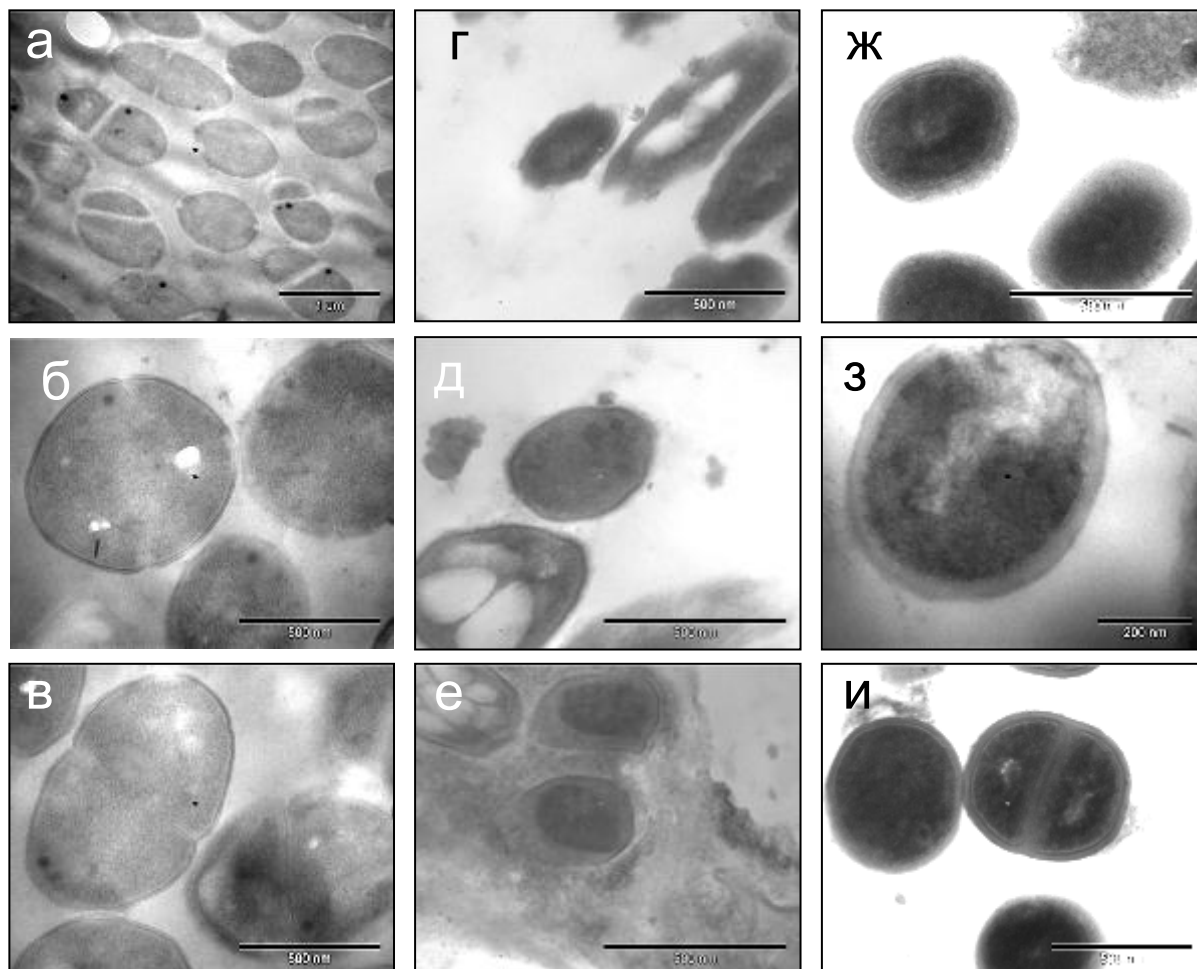


Рис. 5. Электронные микрофотографии (ТЕМ) развития бактерий: а, б, в – морфология клеток в культивируемом состоянии; г, д, е – при переходе в некультивируемое, но жизнеспособное состояние; ж, з, и – морфология клеток после процесса «реанимации»

Таким образом, в экспериментальных условиях установлен один из возможных механизмов выживания и сохранения жизнеспособности энтерококков в байкальской воде. Сохранение клетки в байкальской воде при низкой ее температуре происходит за счет образования более плотной и большей по толщине клеточной стенки, которая увеличивается в размерах в несколько раз. Следует отметить, что эти микроорганизмы используются как индикаторы фекального загрязнения воды, поэтому наибольший интерес состояние жизнеспособности, но некультивируемости представляет для процедуры санитарно-гигиенического состояния и качества питьевой воды, а также для мониторинга природных вод.

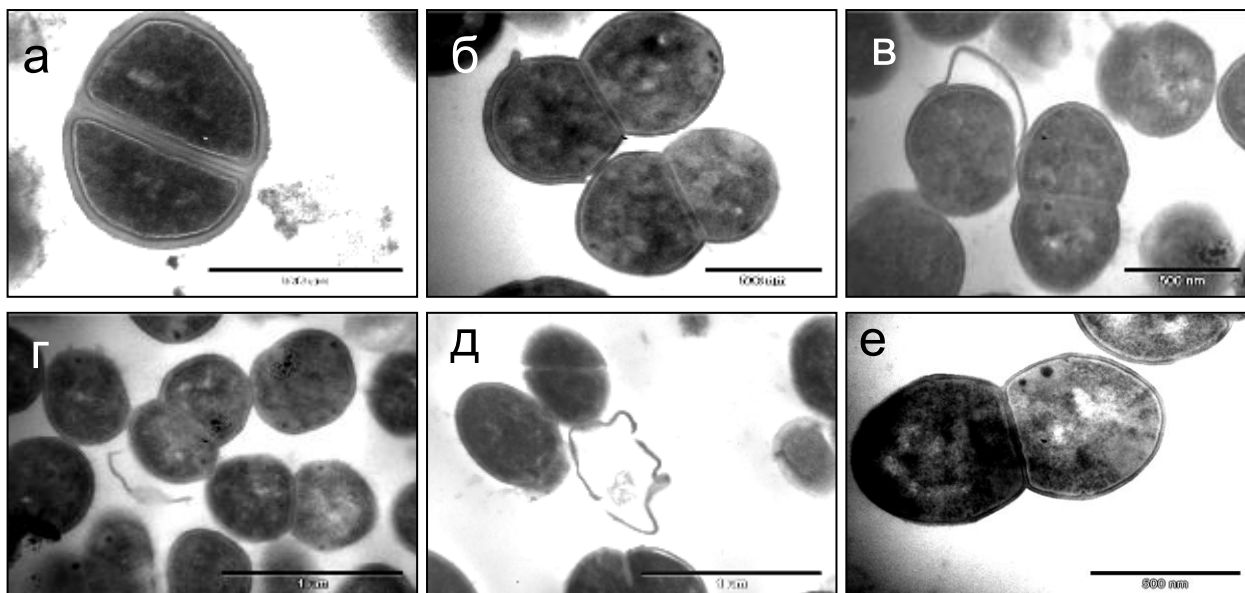


Рис. 6. Электронные микрофотографии (ТЕМ) клеток энтерококков: а – клетка в некультивируемом, но жизнеспособном состоянии; б-д – клетки энтерококков после процесса «реанимации»; е – делящаяся клетка после VBNC состояния

5.2. Изучение влияния химических и физических факторов на выживание энтерококков в воде озера Байкал в экспериментальных условиях

Хлорирование воды в России – наиболее распространенный метод обеззараживания воды с 1910 года. Действие хлора проявляется особенно сильно в течение первых 30 мин. контакта. При этом из патогенных микроорганизмов наиболее чувствительны к хлору возбудители брюшного тифа, дизентерии и холеры. Паратиф В, энтерококки, а также вирусы являются более резистентными.

При изучении устойчивости бактерий рода *Enterococcus* к различным концентрациям хлора было выяснено, что максимальные концентрации гипохлорита кальция в стерильной воде, без добавления питательных веществ, на бактерии рода *Enterococcus* производят сильный бактерицидный эффект. Однако в стерильной байкальской воде при меньших концентрациях хлора, равных 0,6 мг/л и 0,3 мг/л, бактерии все еще продолжают культивироваться даже после 30-минутной обработки, и только по истечению 3 часов погибают. Обратная картина наблюдается при культивировании данных микроорганизмов в байкальской воде с различными концентрациями хлора при наличии питательных веществ. При этом жизнеспособные клетки выявляются даже при действии максимальных концентраций хлора после 30-минутной обработки. Через сутки бактерии рода *Enterococcus* не только не погибают в данных условиях, но и активно развиваются и наращивают свою биомассу. Дальнейшие исследования при помощи сканирующей и трансмиссионной микроскопии показали, что при наличии питания клетки не изменяют свою морфологию при воздействии на них как минимальных, так и максимальных концентраций хлора (рис. 7).

В результате эксперимента установлено, что при концентрациях хлора равных 0,6 мг/л и 0,3 мг/л клетки энтерококков остаются жизнеспособными даже после 30-минутной обработки. Эта устойчивость особенно опасна в аспекте загрязнения водопроводных сетей, так как водопроводные сети являются потенциальным источником вторичного микробного загрязнения на изношенных участках и при возникновении аварийных ситуаций.

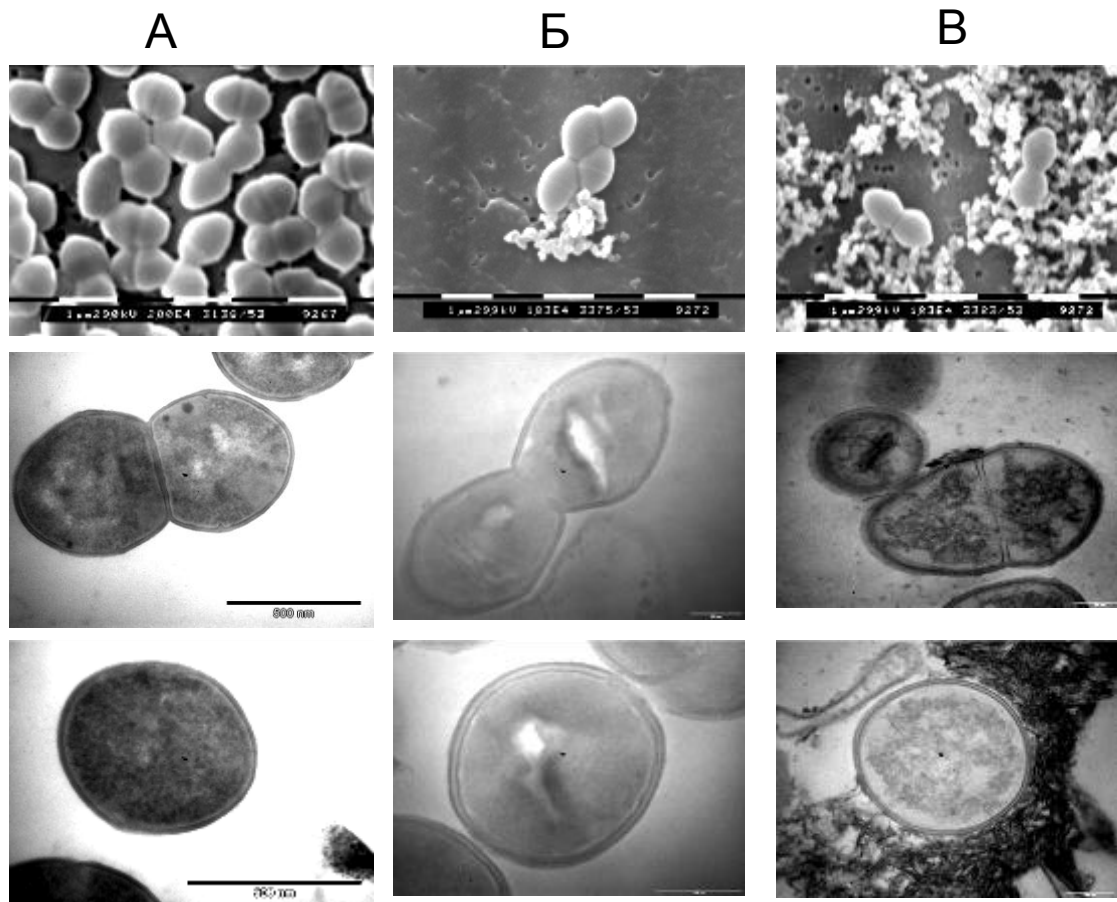


Рис. 7. Клетки энтерококков в байкальской воде без добавления хлора (А), они же при действии минимальной (Б) и максимальной концентрации хлора (В)

Более совершенным методом обеззараживания воды считается озонирование. Известно, что механизм воздействия окислителя состоит в разрушении бактерий путем инактивации бактериальных протеинов, то есть диффузией через мембрану клетки в цитоплазму с поражением жизненных центров (Вольф и др., 1973). В поисках эффективного метода обеззараживания воды были проведены экспериментальные исследования по изучению влияния озона на выживание бактерий рода *Enterococcus* в байкальской воде (табл. 1).

Только к концу второго часа происходили существенные различия в выживании энтерококков в обеих колбах. В колбе без питательных веществ происходит резкое уменьшение численности микроорганизмов, и только 180 клеток из 15×10^5 , внесенных в начале эксперимента, остаются жизнеспособными. В это же время энтерококки в колбах с питательными веществами показывают значительную устойчивость при действии на них озона, и $2,8 \times 10^3$ клеток все еще продолжают культивироваться. К концу

эксперимента, через 24 часа, клетки в колбе с озонированной водой без питательных веществ погибают, в отличие от клеток, которые были помещены в колбы, содержащие органические вещества. Здесь клетки остаются жизнеспособными и продолжают размножаться.

Табл. 1

Влияние озона на выживаемость бактерий рода *Enterococcus*
в байкальской воде

Время (мин)	БВ + клетки (контроль)	БВ + клетки +ПВ (контроль)	БВ + клетки + озон	БВ + клетки + озон + ПВ	БВ (контроль)
0	КОЕ в 1 мл экспериментальной суспензии, 15×10^5				0
1	-	-	21×10^5	17×10^5	-
3	-	-	13×10^5	13×10^5	-
5	-	-	7×10^5	18×10^5	-
7	-	-	6×10^5	20×10^5	-
10	-	-	7×10^5	16×10^5	-
20	-	-	7×10^5	16×10^5	-
30	-	-	7×10^5	15×10^5	-
40	-	-	14×10^5	18×10^5	-
50	-	-	5×10^5	7×10^5	-
60	-	-	2×10^5	$2,8 \times 10^3$	-
120	-	-	180	$2,5 \times 10^3$	-
180	23×10^5	100×10^5	130	2×10^3	0
Сутки	370×10^5	3400×10^5	0	240×10^5	0

В начале эксперимента концентрация озона составляла 7 мг/л, а через 3 ч – 2,3 мг/л; «←» аликвоты не отбирались; БВ – байкальская вода; ПВ – питательные вещества

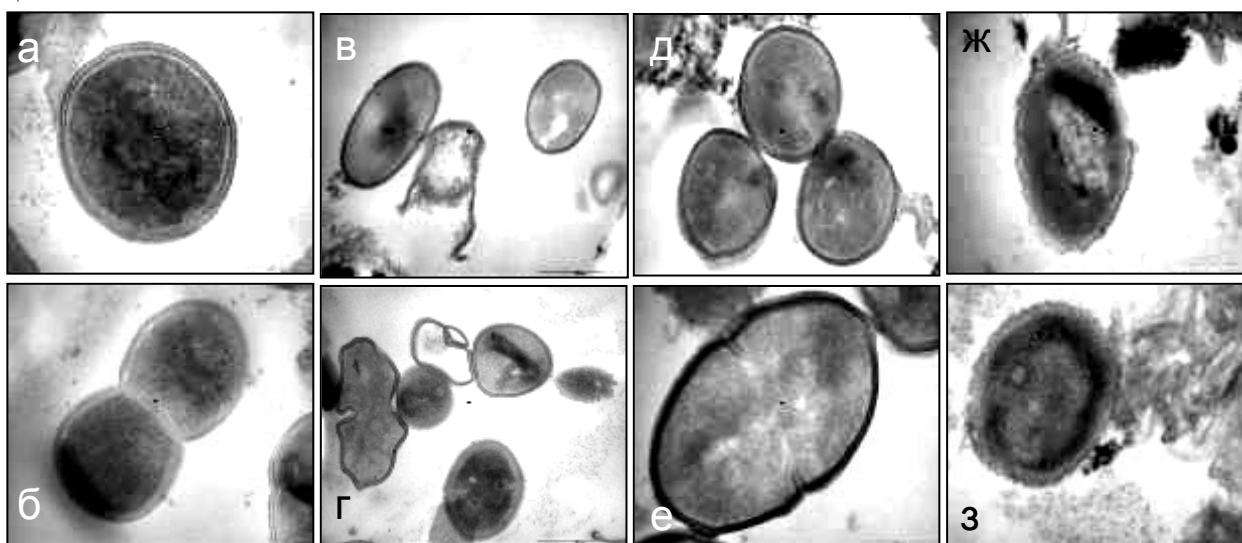


Рис. 10. Клетки бактерий рода *Enterococcus* в байкальской воде без озона (а, б); клетки энтерококков через 3 ч. в байкальской воде с озоном без питания (в, г) и через 3 ч. при наличии питательных веществ (д, е); поперечный разрез клеток через сутки в озонированной байкальской воде без питания (ж, з)

Дальнейшие исследования при помощи трансмиссионной микроскопии показали, что в результате действия озона без наличия питательных веществ клетки энтерококков претерпевают значительные изменения (рис. 10).

Итак, модельными экспериментами показано, что часть бактерий рода *Enterococcus* в озонированной воде, не содержащей дополнительного органического вещества, являются устойчивыми к действию озона в течение часа, и эта устойчивость увеличивается при наличии питательных веществ. Таким образом, на практике необходимо учитывать, что обеззараживание воды озоном не может быть единственным универсальным методом очистки, избавляющим воду от посторонней микрофлоры, а также от всех возможных загрязнений, и должно являться только одной из ступеней водоподготовки.

ВЫВОДЫ

1. Пространственное распределение бактерий рода *Enterococcus* носит неравномерный, локальный характер; их обнаружение указывает на приуроченность к населенным пунктам, устьям основных притоков, местам сброса недостаточно очищенных хозяйственно-бытовых стоков.

2. Изучение видового состава показало, что доминирующими видами являются *E. faecium*, *E. avium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum*, которые могут рассматриваться как специфические индикаторы поступления вод фекального происхождения.

3. Антибиотикоустойчивость и гемолитическая активность бактерий рода *Enterococcus* является показателем влияния антропогенного фактора на санитарно-бактериологическую характеристику качества воды озера Байкал в прибрежных районах.

4. Адаптационные возможности выживания исследуемых бактерий в особых экологических условиях озера Байкал обусловлены переходом их в некультивируемое состояние, позволяющее сохранять при этом свою жизнеспособность. Это затрудняет обнаружение бактерий рода *Enterococcus* в воде при проведении традиционного культивирования на диагностических средах, что необходимо учитывать при проведении экологических исследований. При этом установлен один из механизмов сохранения клеток в условиях озера, а именно: изменение структуры клеточной стенки за счет увеличения ее плотности и размеров в несколько раз.

5. Модельными экспериментами установлено, что в чистой воде, не содержащей дополнительного органического вещества, энтерококки являются устойчивыми к озону в течение часа и к хлору – в течение 30 минут; эта устойчивость увеличивается в присутствии органических веществ. Таким образом, установлено, что обеззараживание только этими методами при водоподготовке питьевой воды не может полностью обеспечить ее должное качество, поэтому необходимо проводить мероприятия по удалению взвешенных веществ методом фильтрации.

6. При проведении санитарно-микробиологической оценки качества воды необходимо проводить исследование не только на наличие представителей

семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующей группы микроорганизмов, но и бактерий рода *Enterococcus*.

7. Установлено что глубинные воды озера Байкал могут успешно использоваться для питьевого водоснабжения без принятых методов дезинфекции, а воды литоральной части и в местах возможного антропогенного влияния только после дополнительной очистки.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Парфенова В. В., **Кравченко О. С.**, Павлова О. Н. Распределение и антибиотикорезистентность бактерий рода *Enterococcus*, изолированных из воды озера Байкал // Сибирский медицинский журнал. - 2008. - № 3. - С. 78-81.

2. Парфенова В. В., Павлова О. Н., **Кравченко О. С.**, Суслова М. Ю., Косторнова Т. Я., Никулина И. Г., Иванов В. Г., Фикель Я., Обст У. Изучение распространения бактерий рода *Enterococcus* в аспекте оценки качества воды озера Байкал // Сборник докладов конгресса ЭКВАТЭК. - 2008. - 7 стр.

3. Парфенова В. В., **Кравченко О. С.**, Павлова О. Н., Косторнова Т. Я., Никулина И. Г. Качество вод озера Байкал, проблемы и перспективы ее использования // Производственно-технический и научно-практический журнал «Водоочистка. Водоподготовка. Водоснабжение». – 2009. - № 1. - С.48-54.

4. Парфенова В. В., **Кравченко О. С.**, Павлова О. Н., Косторнова Т. Я., Никулина И. Г., Томберг И. В., Иванов В. Г., Мейер Й., Джайтер Д., Фикель Я., Баксман Т., Обст У. Изучение локального антропогенного влияния на горизонтальное и вертикальное распределение микроорганизмов в воде оз. Байкал // Гидробиологический журнал. Киев – 22 стр. (принята в печать).

5. Парфенова В. В., Павлова О. Н., **Кравченко О. С.**, Тулупова Ю. Р., Косторнова Т. Я. Изучение распределения, видового состава и степени устойчивости к антибиотикам бактерий рода *Enterococcus* в воде озера Байкал // Сибирский Экологический журнал. Новосибирск – 14 стр. (принята в печать).

6. Парфенова В. В., Павлова О. Н., **Кравченко О. С.**, Мейер Й., Обст У. Распределение и количественная характеристика бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из озера Байкал // Всероссийская конференция «Биоразнообразие экосистем Внутренней Азии». – Улан–Удэ. - 2006. - С 67-68.

7. **Кравченко О. С.**, Парфенова В. В. К вопросу о механизме выживания бактерий рода *Enterococcus* в байкальской воде // Международная молодежная школа-конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии». – Москва. - 2006. - С.20-21.

8. **Кравченко О. С.**, Парфенова В. В., Павлова О. Н., Фикель Я., Обст У. Механизм выживания энтерококков в озере Байкал // Международная молодежная научно-методическая конференция «Проблемы молекулярной и клеточной биологии». – Томск. - 2007. - С. 104-105.

9. **Кравченко О. С.**, Парфенова В. В. Распространение бактерий рода *Enterococcus* в дельте реки Селенги // II Международный Байкальский Микробиологический симпозиум «Микроорганизмы в экосистемах озер, рек и водохранилищ». – Иркутск. - 2007. - С. 119.

10. **Kravchenko O. S.**, Parfenova V. V. Role of the bacteria of *Enterococcus* genera for evaluating quality of water // Materials of III International Young Scientists conference. – Odessa. - 2007. - P. 155.

11. Парфенова В. В., **Кравченко О. С.**, Павлова О. Н., Косторнова Т. Я. Микробиологические и молекулярно-биологические исследования качества воды озера Байкал в аспекте разработки системы дезинфекции потенциально-опасных микроорганизмов в питьевой воде // Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2007 г. в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно – технологического комплекса России на 2007 – 2012 годы». – Москва. - 2007. - С. 208-209.

12. Парфенова В. В., **Кравченко О. С.**, Павлова О. Н. Бактерии рода *Enterococcus* как показатели качества природных вод // VI Международный симпозиум «Контроль и реабилитация окружающей среды». – Томск. - 2008. - С. 50-52.

13. **Кравченко О. С.**, Парфенова В. В., Павлова О. Н. Антибиотикорезистентность бактерий рода *Enterococcus*, изолированных из воды озера Байкал // Материалы межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 10-летию организации Научных центров ВСНЦ СО РАМН «Человек: здоровье и экология». – Иркутск. - 2008. - С. 67.

14. Obst U., Parfenova V. V., Fickel J., Pavlova O. N., **Kravchenko O. S.**, Braendle M., Schwartz T. Persistence and potential dormancy of Enterococci from lake Baikal and lake Constance // International Symposium. – Australia. - 2008. - 1 p.

15. **Кравченко О. С.**, Павлова О. Н., Сусллова М. Ю., Парфенова В. В. Изучение влияния гипохлорита кальция на выживание в байкальской воде рода *Enterococcus* в экспериментальных условиях // IV Молодежная школа-конференция «Актуальные аспекты современной микробиологии». – Москва. - 2008. - 2 с.

16. Парфенова В. В., Павлова О. Н., **Кравченко О. С.** Микробиологические и молекулярно-биологические исследования качества воды озера Байкал в аспекте разработки системы дезинфекции потенциально-опасных микроорганизмов в питьевой воде // Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2008 г. в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно – технологического комплекса России на 2007 – 2012 годы». – Москва. - 2008. - С. 54-56.

17. Парфенова В. В., Земская Т. И., Павлова О. Н., Косторнова Т. Я., Никулина И. Г., **Кравченко О. С.**, Сусллова М. Ю. Свидетельство о государственной регистрации базы данных, № 2009620013 «Санитарно-бактериологические показатели качества воды акватории озера Байкал».