

УДК 614.7

ФЕРМЕНТЫ ПАТОГЕННОСТИ У БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДЫ ОТКРЫТЫХ ВОДОЁМОВ

П.В. Журавлёв, В.В. Алешня, О.П. Панасовец

ФБУН «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

Проведены исследования по изучению ряда ферментов патогенности (ДНК-аза, лецитиназа, фосфатаза) и гемолитической активности у клебсиелл, синегнойных палочек, сальмонелл и *E. coli*, выделенных из воды основных водоемов Ростовской области (Цимлянское водохранилище, Нижний Дон). Установлено, что нарастание антропогенной нагрузки на водные экосистемы способствовало увеличению количества бактерий, содержащих ферменты патогенности, то есть усилению адаптационных свойств изучаемых бактерий.

Ключевые слова: открытые водоемы, бактерии, ферменты патогенности.

P.V. Zhuravlyov, V.V. Aleshnya, O.P. Panasovets □ **PATHOGENICITY FERMENTS OF BACTERIA ISOLATED FROM WATER OF THE OPEN RESERVOIRS** □ Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia.

We conducted a study on the pathogenicity of some ferments (DNA-ase, lecithinase, phosphatase) and hemolytic activity of *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* and *E.coli*, isolated from water of the main water reservoirs in the Rostov region (Tsimlyansk Reservoir, Lower Don). It was found that the growth of the antropotechnogenic impact on the aquatic ecosystems contributed to the increase in the number of bacteria containing pathogenicity enzymes, that is to the strengthening of the adaptive properties of the studied bacteria.

Key words: open reservoirs, bacteria, pathogenicity ferments.

Основным критерием опасности биологического загрязнения водоемов и питьевой воды является возникновение острых кишечных инфекций (ОКИ) среди населения, пользующегося недоброкачественной водой. Значимость этого критерия определяется тем, что вода, загрязненная инфекционными агентами, обуславливает как повышенный фон спорадической заболеваемости, так и возникновение вспышек кишечных инфекций, то есть оказывает быстрое влияние на здоровье населения.

В литературе достаточно хорошо освещен вопрос о выделении микроорганизмов из открытых водоемов и питьевой воды, в том числе патогенных и потенциально патогенных бактерий [3, 10, 12]. В меньшей степени представлены сведения о свойствах микрофлоры, выделенной из водной среды. Известно, что в результате интенсивного загрязнения водных объектов может происходить значительное изменение свойств бактерий, и тогда бывшие сапрофиты проявляют агрессивные качества [14, 17]. Характер изменения биоценоза бактерий, имеющих медицинское значение, приобретает особое значение при оценке санитарного режима водоемов и прогнозирования условий водопользования с определением микробного риска возникновения бактериальных кишечных инфекций при оценке состояния здоровья населения в системе социально-гигиенического мониторинга [1, 3].

В водных объектах, помимо качественных и количественных изменений микробных сообществ, наблюдаются изменения биологических свойств циркулирующих микроорганизмов, что связано с воздействием на них неблагоприятных факторов среды. В механизме негативного воздействия бактерий на человека ведущее место занимают их патогенные свойства, поскольку эти свойства во многом определяют тя-

жесть поражения организма человека и длительность течения заболевания [1, 2, 6]. Известно, что у патогенных энтеробактерий основным повреждающим потенциалом являются токсины и ряд факторов патогенности.

У потенциально патогенных микроорганизмов (ППМ) также выявлен ряд факторов, способных при определенных условиях оказывать патогенное воздействие на организм человека. В борьбе за существование и для сохранения биологического вида ППМ приобретают факторы патогенности, потенциальная угроза которых обеспечивается, в частности, ферментами патогенности [6, 15, 16]. Например, одним из ферментов агрессии является лецитиназная активность, ДНК-азная активность относится к основным ферментам вирулентности микробов и является одним из приспособительных механизмов возбудителей инфекционных болезней к меняющимся условиям макроорганизма, фосфатазы – ферменты, катализирующие реакцию расщепления сложнэфирных связей в клеточном метаболизме. Однако данные литературы по факторам патогенности ППМ неоднозначны, что свидетельствует о недостаточном изучении этого вопроса [2, 3].

Цель исследования – изучить ряд ферментов патогенности у бактерий, выделенных из воды открытых водоемов с разной степенью биологического и химического загрязнения.

Материалы и методы. Исследования на наличие санитарно-показательных микроорганизмов в воде поверхностных водоемов проводили в соответствии с МУК 4.2.1884–04 [11].

Определение потенциально патогенной микрофлоры проводилось согласно МР № 01-19/98–17 [13] и МР «Использование усовершенствованной питательной среды для выделения и идентификации синегнойных бактерий» [5]. Идентификацию клебсиелл проводили соглас-

но МР «Обнаружение и количественный учет клебсиелл при целевых исследованиях объектов окружающей среды» [9], идентификацию синегнойных палочек – согласно МР «Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях)» [8].

Для выделения и количественного учета сальмонелл использовали «Питательную среду для накопления сальмонелл, готовую к применению» (ТУ 9385-001-01898776-2008, РУ № ФСР 2009/05759 от 29.09.2009), с дальнейшим пересевом на плотные дифференциально-элективные среды согласно МР «Использование готовой к применению питательной среды для выделения сальмонелл из водных объектов» [4].

Определение ферментов патогенности проводилось согласно Приказу МЗ СССР от 22 апреля 1985 года № 535 [7].

Изучение ферментов патогенности у клебсиелл, изолированных из воды основных водоемов Ростовской области, проводилось на 214 штаммах *K. pneumoniae* (94 штамма – Цимлянское водохранилище, 120 штаммов – Нижний Дон), имеющих типичные для данного вида морфологические, культуральные и биохимические свойства.

Результаты исследования. В связи с вышеизложенным, были проведены исследования по изучению ряда ферментов патогенности (ДНК-азной, лецитиназной и фосфатазной активности) у клебсиелл, выделенных из воды основных водоемов Ростовской области (Цимлянское водохранилище и Нижний Дон), имеющих разный уровень биологического и химического загрязнения, в периоды: 1996–2000 и 2006–2010 гг. Также определялась гемолитическая активность у потенциально патогенных (клебсиеллы и синегнойные палочки) бактерий, выделенных из воды Цимлянского водохранилища и Нижнего Дона в эти же периоды. Кроме того, в период 2008–2010 гг. изучались гемолитическая активность и вышеперечисленные ферменты патогенности у *E. coli* и сальмонелл, а также ферменты патогенности у *P. aeruginosa*, изолированных из воды Нижнего Дона.

Сальмонеллы являются образцом классических патогенных энтеробактерий, идентифицируемых по ферментации глюкозы. *E. coli* – представитель нормируемых лактозоположительных бактерий. Клебсиеллы являются типичными представителями энтеробактерий, широко распространены в водной среде, играют заметную роль в этиологической структуре кишечных инфекций человека, мало изучены биологические свойства клебсиелл, изолированных из водных объектов. Синегнойные палочки являются представителями неферментирующих грамотрицательных бактерий, также широко распро-

странены в водной среде и имеют определенный удельный вес среди ОКИ.

Как видно из табл. 1, гемолитическая активность клебсиелл и синегнойных палочек, выделенных из воды Нижнего Дона, существенно превышала таковую у этих же бактерий, но изолированных из воды Цимлянского водохранилища ($t = 3,67$; $P = 0,001$), что согласуется с более высоким уровнем биологического и химического загрязнения воды Нижнего Дона. Высокий уровень антропогенного загрязнения водоемов, то есть агрессивность водной среды обитания, способствует усилению адаптационных свойств бактерий, в данном случае – факторов патогенности.

Таблица 1. Гемолитическая активность у клебсиелл и синегнойных палочек, выделенных из воды открытых водоемов

Водоем	Период (годы)	Количество бактерий, обладающих гемолитическими свойствами	
		клебсиеллы	синегнойные палочки
Цимлянское водохранилище	1996–2000	43,20	42,7
	2006–2010	56,5	51,4
Нижний Дон	1996–2000	67,8	61,3
	2006–2010	81,3	76,9

Установлено, что гемолитическая активность клебсиелл и синегнойных палочек, выделенных в период 2006–2010 гг. значительно выше, чем в период 1996–2000 гг. ($t = 3,24$; $P = 0,02$ и $t = 3,11$; $P = 0,04$), что связано со спадом промышленного производства в 90-е годы прошлого века и, соответственно, снижением антропогенной нагрузки на водные объекты.

В соответствии с вышеизложенным, наблюдается рост количества потенциально патогенной микрофлоры, обладающей одним из патогенных качеств (гемолитическая активность), которые при определенной инфицирующей дозе могут проявить агрессию по отношению к человеку.

Установлено, что в воде Нижнего Дона более половины, а в воде Цимлянского водохранилища около 50 % выделенных штаммов клебсиелл являются носителями изученных нами ферментов патогенности (табл. 2). Следовательно, количество клебсиелл, способных проявлять патогенные свойства, в воде Нижнего Дона существенно выше такового в воде Цимлянского водохранилища ($t = 2,444$; $P = 0,035$). Соответственно в воде Нижнего Дона доля клебсиелл, обладающих лецитиназной и фосфатазной активностью, превышает эти показатели в воде Цимлянского водохранилища ($t = 2,794$; $P = 0,05$ и $t = 5,245$; $P = 0,006$). Число клебсиелл с ДНК-азной активностью также выше в воде Нижнего Дона, хотя статистически достоверных различий не выявлено.

Таблица 2. Ферменты патогенности у клебсиелл, выделенных из воды открытых водоемов

Водоем	Период (годы)	Кол-во изученных культур	Ферменты патогенности (%)		
			ДНК-азная активность	лецитиназная активность	фосфатазная активность
Цимлянское водохранилище	1996–2000	38	44,4	34,7	49,4
	2006–2010	56	55,7	46,7	57,1
Нижний Дон	1996–2000	56	53,8	48,2	64,3
	2006–2010	64	64,2	56,3	68,8

Показано, что у изученных штаммов клебсиелл из определяемых нами ферментов патогенности чаще выявлялась фосфатазная активность, затем – ДНК-азная и лецитиназная, но статистически достоверных различий между количеством штаммов с ДНК-азной и фосфатазной активностью не выявлено. В то же время установлена корреляционная связь между

частотой встречаемости у клебсиелл с лецитиназной и ДНК-азной, лецитиназной и фосфатазной активностью ($r = 0,982$, $P = 0,02$ и $r = 0,960$, $P = 0,04$). Анализ частоты встречаемости ферментов патогенности у клебсиелл показал ее возрастание в период 2006–2010 гг. по сравнению с 1996–2000 гг. (рис. 1, 2).

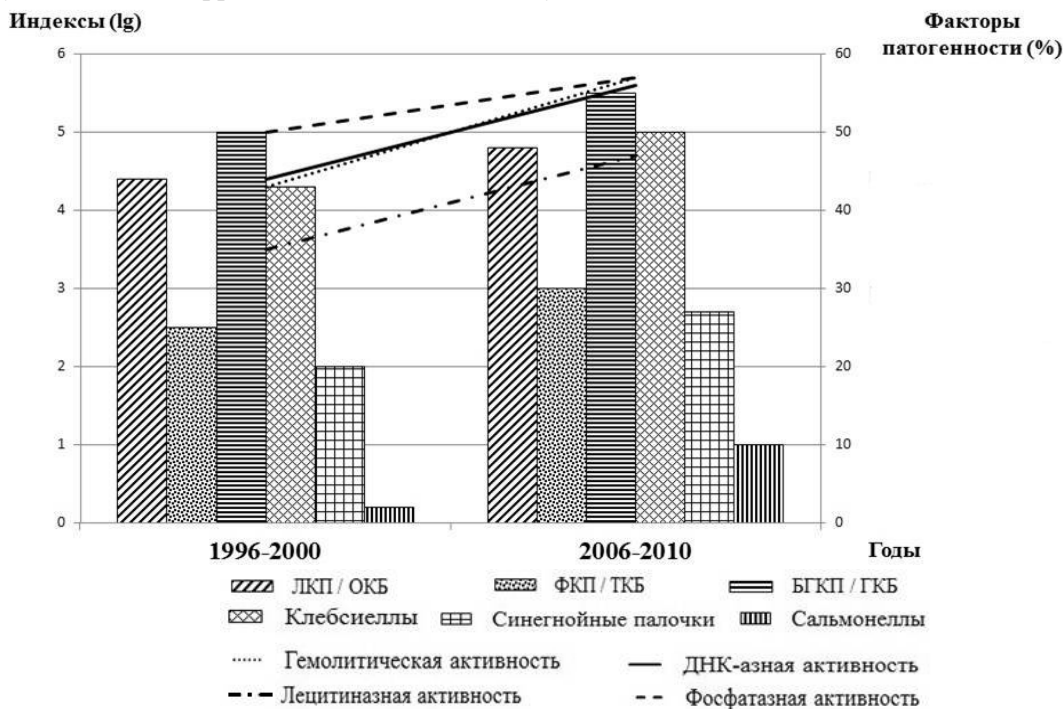


Рис. 1. Сравнение уровня бактериального загрязнения воды Цимлянского водохранилища и наличия факторов патогенности у клебсиелл

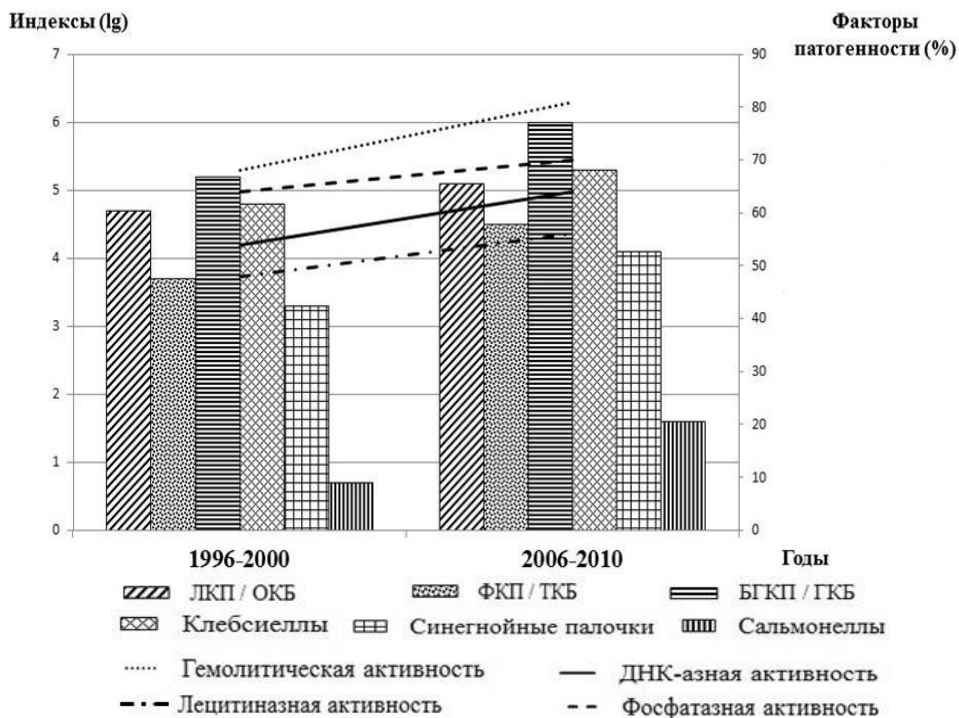


Рис. 2. Сравнение уровня бактериального загрязнения воды Нижнего Дона и наличия факторов патогенности у клебсиелл

Исследования по определению ферментов патогенности у патогенных энтеробактерий (сальмонелл) и кишечных палочек (*E. coli*) показали, что 33,5 % сальмонелл проявляли гемолитическую активность, 26,6 % – ДНК-азную и 21,7 % – лецитиназную. В то же время у *E. coli* гемолитическая активность определялась у 39,2 % штаммов, ДНК-азная – у 31,7 % штаммов, лецитиназная – у 23,3 % штаммов. Среди синегнойных палочек 34,2 % штаммов обладали ДНК-азной активностью и 26,7 % – лецитиназной.

Выводы. Проведенные исследования показали, что представители потенциально патогенной микрофлоры – клебсиеллы и синегнойные палочки – проявляли свои агрессивные качества в большей степени, чем сальмонеллы. Это указывает на более высокие адаптационные возможности ППМ по сравнению с патогенными бактериями, хотя повреждающее воздействие на организм человека сильнее выражено у традиционных патогенов и связано с их высокой токсичностью.

Установлено что, чем выше уровень биологического и химического загрязнения водоема (Нижний Дон по сравнению с Цимлянским водохранилищем), тем агрессивнее становятся изучаемые бактерии. Нарастание антропогенной нагрузки на водные экосистемы (в период с 2006 по 2010 год по сравнению с 1996 по 2000 год) способствовало увеличению количества бактерий, содержащих ферменты патогенности, то есть усилению адаптационных свойств изучаемых бактерий. Наконец, присутствие в воде штаммов бактерий, обладающих факторами патогенности, указывает на эпидемиологическую опасность водопользования.

ЛИТЕРАТУРА (п. 14–17 см. References)

1. Айдинов Г.Т. и др. Применение многомерных статистических методов в задачах совершенствования информационно-аналитического обеспечения системы социально-гигиенического мониторинга / Б.И. Марченко, Л.В. Софьяникова, Ю.А. Синельникова // *Здоровье населения и среда обитания*. 2015. № 7 (268). С. 4–8.
2. Анганова Е.В. Биологические свойства условно патогенных бактерий водных экосистем // *Гигиена и санитария*. 2010. № 5. С. 67–68.
3. Загайнова А.В. и др. Оценка эпидемической опасности патогенных и условно-патогенных бактерий, выделенных из воды различного вида водопользования / А.В. Загайнова, Ю.Г. Талаева, Р.А. Дмитриева // *Гигиена и санитария*. 2010. № 5. С. 68–73.
4. Использование готовой к применению питательной среды для выделения сальмонелл из водных объектов: Методические рекомендации. Ростов-на-Дону, 2012. 44 с.
5. Использование усовершенствованной питательной среды для выделения и идентификации синегнойных бактерий: Методические рекомендации. М., 1978. 11 с.
6. Литвин В.Ю. и др. Факторы патогенности бактерий: функции в окружающей среде / В.Ю. Литвин, В.И. Пушкарёва // *ЖМЭИ*. 1994. № 1. С. 83–87.
7. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: Приказ МЗ СССР от 22 апреля 1985 года № 535.
8. Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях): Методические рекомендации. М., 1984. 17 с.
9. Обнаружение и количественный учёт клебсиелл при целевых исследованиях объектов окружающей среды: Методические рекомендации. М., 1982. 8 с.
10. Савилов Е.Д. и др. Микробиологический мониторинг водных экосистем / Е.Д. Савилов, Е.В. Анганова // *Гигиена и санитария*. 2010. № 5. С. 56–58.
11. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов: МУК 4.2.1884–04. М., 2005. 62 с.
12. Синода В.А. Санитарное состояние водных объектов и проблемы питьевого водопользования населения Тверской области // *Здоровье населения и среда обитания*. 2009. № 3 (192). С. 43–44.
13. Усовершенствованный метод обнаружения энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов в объектах водной среды: МР № 01-19/98–17. Ростов-на-Дону, 1996.

REFERENCES

1. Ajdinov G.T., Marchenko B.I., Sofjanikova L.V., Sinel'nikova Ju.A. Primenenie mnogomernykh statisticheskikh metodov v zadachkh sovershenstvovaniya informatsionno-analiticheskogo obespecheniya sistemy social'no-gigienicheskogo monitoringa [The use of multivariate statistical methods in the task of improving information and analytical support system of socio-hygienic monitoring]. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*, 2015, no. 7 (268), pp. 4–8 (in Russian).
2. Anganova E.V. Biologicheskie svoystva uslovno-patogennykh bakterij vodnykh ekosistem [Biological properties of opportunistic pathogenic bacteria of aquatic ecosystems]. *Gigiena i sanitariya*, 2010, no. 5, pp. 67–68 (in Russian).
3. Zagaynova A.V., Talaeva Ju.G., Dmitrieva R.A. Otsenka epidemicheskoy opasnosti patogennykh i uslovno-patogennykh bakterij, vydelennykh iz vody razlichnogo vida vodopol'zovaniya [Assessment of epidemic danger of pathogenic and opportunistic pathogenic bacteria isolated from water of various water use]. *Gigiena i sanitariya*, 2010, no. 5, pp. 68–73 (in Russian).
4. Ispol'zovanie gotovoy k primeneniju pitatel'noy sredy dlja vydeleniya sal'monell iz vodnykh objektov: Metodicheskie rekomendatsii [The use of ready-to-use nutrient medium for isolation of Salmonella from water objects: Methodical recommendations]. Rostov-on-Don, 2012, 44 p. (in Russian).
5. Ispol'zovanie usovershenstvovannoy pitatel'noy sredy dlja vydeleniya i identifikatsii sinegnoynykh bakterij: Metodicheskie rekomendatsii [Improved nutrient medium for isolation and identification of Pseudomonas bacteria: Methodical recommendations]. Moscow, 1978, 11 p. (in Russian).
6. Litvin V.Ju., Pushkarjova V.I. Faktory patogennosti bakterij: funktsii v okruzhajushhej srede [Factors of bacteria pathogenicity: functions in the environment]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*, 1994, no. 1, pp. 83–87 (in Russian).
7. Ob unifikatsii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya, primenjaemykh v kliniko-diagnosticheskikh laboratorijakh lechenno-profilakticheskikh uchrezhdenij: Prikaz MZ SSSR ot 22 aprelya 1985 goda № 535 [Unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions: Order of Ministry of Health of the USSR of 22 April 1985, no. 535] (in Russian).
8. Obnaruzhenie i identifikatsiya Pseudomonas aeruginosa v objektakh okruzhajushchej sredy (pishchevykh produktakh, vode, stochnykh zhidkostyakh): Metodicheskie rekomendatsii [Detection and identification of Pseudomonas aeruginosa in the environment (food, water, waste liquids): Methodical recommendations]. Moscow, 1984, 17 p. (in Russian).
9. Obnaruzhenie i kolichestvennyj uchjot klebsiell pri celevykh issledovaniyakh objektov okruzhajushhej sredy: Metodicheskie rekomendatsii [Detection and quantitation of Klebsiella in case studies of environmental objects: Methodical recommendations]. Moscow, 1982, 8 p. (in Russian).
10. Savilov E.D., Anganova E.V. Mikrobiologicheskij monitoring vodnykh ekosistem [Microbiological monitoring of water systems]. *Gigiena i sanitariya*, 2010, no. 5, pp. 56–58 (in Russian).
11. Sanitarno-mikrobiologicheskij i sanitarno-parazitologicheskij analiz vody poverkhnostnykh vodnykh objektov: MUK 4.2.1884–04 [Sanitary-microbiological and sanitary-parasitological analysis of water of surface water objects: MUK 4.2.1884–04]. Moscow, 2005, 62 p. (in Russian).
12. Sinoda V.A. Sanitarnoe sostojanie vodnykh objektov i problemy pit'evogo vodopol'zovaniya naselenija Tverskoj oblasti [Sanitary condition of water bodies and issues of drinking water use of the population of Tver region]. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*, 2009, no. 3 (192), pp. 43–44 (in Russian).
13. Usovershenstvovannyj metod obnaruzheniya enterobakterij i nefermentirujushchikh gramotritsatel'nykh mikroorganizmov v objektakh vodnoj sredy: MR № 01-19/98–17 [An improved method for the detection of enterobacteria and non-fermenting gram-negative microorganisms in the aquatic environment: MR № 01-19/98–17]. Rostov-on-Don, 1996 (in Russian).
14. Balaji V. et al. Cytotoxin esting of environmental Aeromonas spp. In Vero cell culture / V. Balaji, M.V. Jesudason, G. Sridharan // *Indian J. Med. Res.* 2004. V. 119. no. 5. pp. 186–189.
15. Ghenghesh K.S. et al. Prevalence, species differentiation, haemolytic activity, and antibiotic susceptibility of aeromonads in untreated well water / K.S. Ghenghesh, A. El-Ghodban, R. Dkagni // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2001. V. 96. no. 2. pp. 169–173.
16. Pavlov D. et al. Determination of cytotoxicity and invasiveness of heterotrophic plate count bacteria isolated from drinking water / D. Pavlov, Wet C.M. de, W.O. Grabow, M.M. Ehlers // *Water Supply*. 2002. V. 2. no. 3. pp. 115–122.
17. Sen K. et al. Distribution of six virulence factors in Aeromonas species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification / K. Sen, M. Rodgers // *J. Appl. Microbiol.* 2004. V. 97. no. 5. pp. 1077–1086.

Контактная информация:

Журавлёв Петр Васильевич,
тел.: +7 (908) 510-57-29,
e-mail: pitthegreat@yandex.ru

Contact information:

Zhuravlyov Petr,
phone: +7 (908) 510-57-29,
e-mail: pitthegreat@yandex.ru