

© Фомина И.А., Саванина Я.В., Барский Е.Л., Лобакова Е.С., 2018

УДК 581.192.546

ОЦЕНКА САНИТАРНОГО СОСТОЯНИЯ ВОДОТОКОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИАЛИЗНОЙ КУЛЬТУРЫ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

И.А. Фомина¹, Я.В. Саванина², Е.Л. Барский², Е.С. Лобакова²

¹Департамент Федеральной службы по надзору в сфере природопользования по Центральному федеральному округу, Варшавское шоссе, 39а, г. Москва, 117105, Россия

²Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, д. 1, корп. 12, г. Москва, 119899, Россия

Рассмотрен подход, объединяющий использование диффузионной культуры цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 6301 и метод биотестирования на основе определения структурных изменений клеточных белков (показатель ΔP) при различных внешних воздействиях и регистрируемых посредством ИК-спектроскопии внутреннего отражения. Такой подход позволяет оценить качество водной среды в процессе экологического мониторинга как природных водотоков *in situ*, так и в лабораторных условиях.

Ключевые слова: цианобактерии, диализное культивирование, водная токсикология, биотестирование, ИК-спектроскопия внутреннего отражения.

I.A. Fomina, Ya.V. Savanina, E.L. Barsky, E.S. Lobakova □ **EVALUATION OF THE SANITARY CONDITION OF STREAMFLOWS USING DIALYSIS CULTURE OF CYANOBACTERIA** □ Department of the Federal Service for Supervision of Natural Resources in the Central Federal district, 39A, Varshavskoe shosse, Moscow, 117105, Russia; Biological faculty of Lomonosov Moscow State University, 1, bldg. 12, Leninskie Gory str., Moscow, 119899, Russia.

There was considered the approach, combining the use of the cyanobacteria *Synechococcus* SP. PCC 6301 culture diffusion and biotesting method by identifying structural changes of cellular proteins (ΔP index) at various external influences and recorded by internal reflection infrared spectroscopy. This approach allows to evaluate the quality of the water medium in environmental monitoring as natural watercourses *in situ* and in the laboratory conditions.

Key words: cyanobacteria, dialysis cultivation, water toxicology, biotesting, internal reflection infrared spectroscopy.

Для токсикологического контроля сред с неопределенным или сложным составом, включая сточные и загрязненные природные воды, в последние десятилетия часто используются методики биотестирования. В данной работе предлагается один из возможных экспресс-параметров для оценки качества среды для населяющих ее организмов.

Материалы и методы. В качестве тест-объекта для токсикологических опытов использовали 9–11-суточную чистую культуру одноклеточной цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 6301 (далее в тексте *Synechococcus* 6301), инкубируемую в мешках фирмы *Serva* как описано [1]. В полевых экспериментах (летний период 2013 г.) диализные мешки в защитных пластиковых чехлах с отверстиями для водообмена размещали на 2 сут. в точках забора проб; при лабораторных исследованиях проб наблюдались максимально приближенные условия по температуре и освещенности.

В качестве модельных отбирали пробы воды в двух точках реки Москвы: в районе села Каринское выше г. Звенигорода и у места впадения р. Истры в р. Москву (г. Дмитровское). Отбор вели ежемесячно в соответствии с общепринятыми методами; определение химических соединений и показателей фитопланктона проводили совместно в аналитической лаборатории МГУП «Мосводоканал» [3, 4].

Основным измеряемым параметром при оценке состояния клеток цианобактерии-биоиндикатора служила величина разности дихроичных отношений полос поглощения белков целых клеток цианобактерий и их внешних

структур (показатель ΔP) при использовании метода спектроскопии внутреннего отражения в ИК-диапазоне в поляризованном свете [1, 3].

При статистической обработке результатов использовали методы дисперсионного анализа (*Analysis of Variance, ANOVA*) и непараметрические критерии *Kruskal-Wallis test*, *Brown-Mood test*. За величину статистической значимости принимали $\alpha = 0,05$ [3, 4].

Результаты исследования. Для стандартизации физиологических ответов клеток целесообразно использовать однородные популяции. Особенности морфологического строения одноклеточной свободноживущей цианобактерии *Synechococcus* 6301, высокая скорость размножения, чувствительность к неблагоприятным факторам среды делают этот микроорганизм удобным объектом для биотестирования.

Для контроля загрязнения природного водотока *in situ* необходима иммобилизация клеток тест-культуры на носителе. Одной из разновидностей иммобилизованных культур является диффузионное (иначе – диализное) культивирование, при котором клетки культуры отделены от внешнего объема среды мембраной с размерами пор, пропускающих соединения с определенной молекулярной массой (до 10–15 кДа). Наиболее подходящая форма диализного мешка – удлиненный цилиндр, полностью погруженный в 5–10-кратный объем «внешней среды», что обеспечивает высокое соотношение поверхности и объема диализной мембраны. В относительно небольшом объеме диализного мешка накапливается однородная популяция «физиологически молодых», чувствитель-

ных к внешним воздействиям клеток, свободному прохождению молекул токсикантов диализная мембрана не препятствует. Культуру в диализном мешке легко перемещать из одной среды в другую, при этом клетки в диализном мешке остаются в стерильных условиях. Это позволяет как обеспечивать и подготовку тест-культур – истощение клеточных резервов при одновременном удалении продуктов автоингибирования, так и изучать физиологические изменения в любых загрязненных средах [1, 2].

Изменение условий внешней среды вызывает перестройки белковых компонентов клеточных структур фототрофных микроорганизмов, что может быть выявлено с использованием показателя ΔP . Уменьшение величины ΔP , как было показано для ряда микроорганизмов, коррелирует со снижением их физиологической активности [1, 3].

В табл. 1 представлены данные лабораторных исследований мутности и показателя ΔP в лабораторных условиях. Использование методов статистического анализа [3, 4] при оценке влияния уровня загрязненности среды на показатель ΔP позволяет уменьшить влияние неоднородностей условий, при которых проводятся отдельные наблюдения и получить достоверный результат при минимальном количестве исследуемых проб. Для каждой из выборок влияния факторов «месяц» и «место» взятия пробы, а также влияние взаимодействия факторов на ΔP статистически значимо при $p < \alpha = 0,05$, что подтверждается как результатами двухфакторного дисперсионного анализа, так и множественного сравнения (метод Дункана). Средние значения показателя ΔP в мае, июне и июле для т. Каринское и в июле для т. Дмитровское статистически значимо отличаются друг от друга и от всех других средних значений ΔP . Максимальное выборочное среднее $\Delta P = 0,376$ наблюдается в июне в т. Каринское.

Результаты согласуются с данными по степени загрязнения водной среды в этих точках. Содержание таких связанных с эвтрофикацией загрязнителей, как соединения азота и фосфаты, в течение года выше в т. Дмитровское. В т. Каринское органических веществ в количестве, достаточном для определения методом БПК, с июня по ноябрь не обнаружено. Большинство

значений коэффициента корреляции (r) величины индекса ΔP с гидрохимическими показателями проб воды реки Москвы в точках Каринское и Дмитровское превышает уровень 0,5 (табл. 2), что свидетельствует о наличии существенной взаимосвязи между величиной показателя ΔP и уровнем загрязненности водной среды. Статистическая значимость на уровне $\alpha = 0,05$ при оценке влияния на ΔP моделированных загрязнений была обнаружена только для проб «пруд в Бутово» (биогенное загрязнение, рыболовный пруд в рекреационной зоне на придомовой территории) [4].

Эксперименты в природных условиях показали, что в августе и особенно в сентябре показатель ΔP заметно ниже по сравнению с его значением, полученным в июле. Возможно, это связано с замедлением обменных процессов у микроорганизмов в связи с сезонным снижением температуры и освещенности в водоеме. При этом разница ΔP , которая отражает уровень загрязненности водной среды между точками отбора проб, сохраняется [4]. Таким образом, при равных условиях величина ΔP зависит, главным образом, от загрязненности водной среды. Ранее показано [3, 4], что влияние на показатель ΔP таких факторов, как начальная концентрация клеток тест-культуры, длительность инкубации и объем исследуемой среды в пределах, заданных условиями эксперимента, статистически не значимо.

Зависимость гидрохимических показателей исследуемых проб от уровня поверхностного смыва, а также появление колиморфных бактерий в майских пробах фитопланктона (т. Дмитровское) привели к необходимости исследовать также пробы донного грунта и близлежащих почв. Известно, что часть поступающих в водоемы веществ, включая токсиканты, накапливается в грунтах.

Подход, основанный на измерении показателя ΔP , дополняет существующий набор биотестов, т.к. отражает не только прямое токсикологическое воздействие отдельных загрязняющих веществ, но и косвенные эффекты: взаимодействие и превращение загрязняющих веществ, влияние неконтролируемых загрязнителей, что расширяет возможности для оценки уровня загрязнения водных объектов.

Таблица 1. Показатели мутности и ΔP в пробах воды реки Москвы в точках Каринское и Дмитровское в течение 2012 г.

Месяц	Точка отбора	Средняя величина ΔP для пробы в реке (проток)	Средняя величина ΔP при внешнем объеме 2 л	Средняя величина ΔP при внешнем объеме 0,5 л
июль	Каринское	0,26	0,25	0,25
	Дмитровское	0,21	0,20	0,19
август	Каринское	0,17	0,16	0,15
	Дмитровское	0,15	0,14	0,14
сентябрь	Каринское	0,10	0,09	0,09
	Дмитровское	0,07	0,06	0,06

Таблица 2. Коэффициенты корреляции величины индекса ΔP с гидрохимическими показателями проб воды реки Москвы в точках Каринское и Дмитровское в течение 2012 г.

№ п/п	Гидрохимический показатель	Коэффициент корреляции r в точках отбора проб	
		Каринское	Дмитровская
1	Аммоний	0,42	0,62
2	Нитраты	0,58	0,51
3	Нитриты	0,75	0,32
4	Сульфаты	0,57	0,64
5	Фосфаты	0,50	0,60
6	Хлориды	0,51	0,35
7	ПБК	0,46	0,59

ЛИТЕРАТУРА

1. Барский Е.Л., Саванина Я.В., Фомина И.А. и др. Оценка качества водной среды с использованием цианобактерий // Материалы XXIV Международн. конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии». Изд-во ООО «Новые информационные технологии», 2015. С. 224–233.
2. Саванина Я.В., Лебедева А.Ф., Барский Е.Л. и др. Диализное культивирование цианобактерий // Вестник Московского университета. Серия: Биология. 2008. № 2. 16–25.
3. Фомина И.А., Саванина Я.В., Барский Е.Л. и др. Метод ИК-спектроскопии внутреннего отражения клеток цианобактерий и их внешних структур для оценки уровня загрязнения водотоков // Проблемы региональной экологии. 2016. № 6. С. 18–22.
4. Фомина И.А., Саванина Я.В., Барский Е.Л. и др. Сравнительная оценка уровня загрязнения водотоков методом спектроскопии внутреннего отражения в ИК-диапазоне клеток диализной культуры цианобактерий и методами химического контроля // Проблемы региональной экологии. 2017. № 3. С. 22–26.

REFERENCES

1. Barsky E.L., Savanina Ja.V., Fomina I.A. et al. Otsenka kachestva vodnoy sredy s ispol'zovaniem cianobakterij [Evaluation of water environment quality with the use of cyanobacteria]. Materialy XXIV Mezhdunarodn. konferencii «Novye informatsionnye tehnologii v meditsine, biologii, farmakologii i ekologii». OOO «Novye informatsionnye tehnologii Publ., 2015, pp. 224–233. (In Russ.)
2. Savanina Ja.V., Lebedeva A.F., Barsky E.L. et al. Dializnoe kul'tivirovanie cianobakterij [Dialysis cultivation of cyanobacteria].

Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya: Biologiya, 2008, no. 2, pp. 16–25. (In Russ.)

3. Fomina I.A., Savanina Ja.V., Barsky E.L. et al. Metod IK-spektroskopii vnutrennego otrazheniya kletok cianobakterij i ih vneshnikh struktur dlja otsenki urovnja zagrazneniya vodotokov [Internal reflection infrared spectroscopy method of cyanobacteria cells and their external structures to assess the level of pollution of streamflows]. Problemy regional'noj ekologii, 2016, no. 6, pp. 18–22. (In Russ.)
4. Fomina I.A., Savanina Ja.V., Barsky E.L. et al. Sravnitel'naja otsenka urovnja zagrazneniya vodotokov metodom spektroskopii vnutrennego otrazheniya v IK-diapazone kletok dializnoj kul'tury cianobakterij i metodami chimicheskogo kontrolja [Comparative assessment of the level of pollution of streamflows by spectroscopy of internal reflection in the IR range of cells of dialysis culture of cyanobacteria and methods of chemical control]. Problemy regional'noj ekologii, 2017, no. 3, pp. 22–26. (In Russ.)

Контактная информация:

Лобакова Елена Сергеевна, доктор биологических наук, профессор, зам. зав. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова
тел.: +7 (495) 939-41-69, e-mail: gene_b@mail.ru

Contact information:

Lobakova Elena, Doctor of Biological Sciences, Professor, Deputy governor of Bioengineering Department of School of Biology of Lomonosov Moscow State University
phone: +7 (495) 939-41-69, e-mail: gene_b@mail.ru

© Березняк Е.А., Тришина А.В., Симонова И.Р., Веркина Л.М., Полеева М.В., 2018

УДК 579.61:615.33:614.7:(470.61)

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДОЕМАХ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ

Е.А. Березняк, А.В. Тришина, И.Р. Симонова, Л.М. Веркина, М.В. Полеева

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора,
ул. Максима Горького, 117/40, г. Ростов-на-Дону, 344002, Россия

В 2016 и 2017 гг. проведено изучение и анализ распространенности в водоемах г. Ростова-на-Дону резистентных к антибактериальным препаратам (АБП) условно-патогенных микроорганизмов (УПМ). Выделено 1 522 штамма, идентифицирован 101 вид микроорганизмов. В 2016 г. доля неферментирующих микроорганизмов (НФМ) составила 45,9 %, энтеробактерий – 28,6 %, аэромонад – 24,9 %. В 2017 г. доминировали представители сем. Аэромонадaceae (39,1 %) и Enterobacteriaceae (37,5 %), доля НФМ составила 23,0 %. Результаты изучения антибиотикорезистентности УПМ показали, что в 2017 г. снизилась доля чувствительных и монорезистентных бактерий, и возросло число штаммов с множественной антибиотикорезистентностью. Резистентные штаммы, выделяемые из внешней среды, необходимо рассматривать как возможные источники угрозы биологической безопасности.

Ключевые слова: условно-патогенные микроорганизмы, водоемы, антибиотикорезистентность.

E.A. Bereznyak, A.V. Trishina, I.R. Simonova, L.M. Verkina, M.V. Poleeva □ PREVALENCE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE OF OPPORTUNISTIC PATHOGENIC MICROORGANISMS IN WATER RESERVOIRS OF ROSTOV-ON-DON CITY □ Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, 117/40 M. Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344002, Russia.

In 2016 and 2017 the study and analysis of the prevalence of opportunistic pathogenic microorganisms (OPM), resistant to antibacterial drugs in the water reservoirs of Rostov-on-Don were carried out. 1522 strains were isolated and 101 species of microorganisms were identified. In 2016 the percentage of non-fermentative microorganisms (NFM) was 45,9 %, Enterobacteriaceae – 28,6 % and Aeromonadaceae – 24,9 %. In 2017 dominating were the representatives of Aeromonadaceae (39,1 %) and Enterobacteriaceae (37,5 %), the portion of NFM amounted to 23,0 %. The results of OPM antibiotic resistance study demonstrate that in 2017 the proportion of sensitive and monoresistant bacteria considerably decreased, and the number of strains with multiple antibiotic resistances increased. The resistant strains isolated from the external environment should be considered as possible sources of threats to biological security.

Key words: opportunistic-pathogenic microorganisms, water reservoirs, antibiotic resistance.

В последние годы в результате продолжающегося интенсивного применения антибиотиков появляются микроорганизмы, устойчивые к различным группам АБП. Это является серьезной проблемой, которая подрывает усилия по борьбе с инфекционными болезнями [4, 8, 9].

Всемирная организация здравоохранения в феврале 2017 г. опубликовала список устойчивых к действию антибиотиков бактерий, так называемых «приоритетных патогенов», пред-

ставляющих наибольшую угрозу для здоровья человека. К первой категории приоритетности – «критически высокий уровень приоритетности» – отнесены бактерии с множественной лекарственной устойчивостью, относящиеся к группе НФМ, – *Acinetobacter*, *Pseudomonas* и различные виды семейства *Enterobacteriaceae* (включая *Klebsiella*, *E.coli*, *Serratia* и *Proteus*) [10].

В последнее время появились доказательства того, что экологические места обитания,