

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ЭНТЕРОКОККОВ ПРИ САНИТАРНО-МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ОБСЛЕДОВАНИЯХ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

## MICROBIOLOGICAL ASPECTS OF INDICATION OF ENTEROCOCCI STRAINS IN SANITARY MICROBIOLOGY STUDY OF WATER BODIES

**A. Martynova**  
**E. Slabenko**  
**O. Singur**  
**T. Lobova**  
**V. Semiglasova**

*Summary.* Enterococci strains are still remaining the keen problem of modern microbiology and are still the subject of discussion of their role as the microorganism with significance as indicating strains. There were noted of some difficulties in cultivating of this microorganism in natural habitat because of low temperatures what restricts of application of this microbe as microbiology indicator. We noted the way of improvement of media for cultivating of enterococci in conditions of low temperatures with supplemental addition of yeast extract.

*Keywords:* enterococci, sanitary microbiology, psychrophilic microorganisms.

**Мартынова Алина Викторовна**

*Д.м.н., профессор, Дальневосточный Федеральный  
Университет; Тихоокеанский государственный  
медицинский университет  
clinmicro@yandex.ru*

**Слабенко Эллада Владимировна**

*К.м.н., доцент, Тихоокеанский государственный  
медицинский университет  
elladaslabenko@mail.ru*

**Сингур Ольга Александровна**

*К.м.н., доцент, Дальневосточный Федеральный  
Университет; Тихоокеанский государственный  
медицинский университет  
Olga.singour@mail.ru*

**Лобова Татьяна Геннадьевна**

*Руководитель Центра лабораторной диагностики,  
Дальневосточный Федеральный Университет  
Lobova@mail.ru*

**Семигласова Виктория Валерьевна**

*Ассистент, Дальневосточный Федеральный  
Университет  
Vikkisemi@mail.ru*

*Аннотация.* Несмотря на пристальное изучение, энтерококки до сих пор вызывают интерес как потенциальный санитарный микроорганизм, однако отмечаются ряд сложностей в культивировании данного микроорганизма при индикации его из объектов окружающей среды, особенно в связи с выделением данного возбудителя при пониженных температурой. Нами было предложено модифицировать микробиологическую среду и другие условия для культивирования энтерококков, идентифицируемых в водных объектах окружающей среды при пониженных температурах.

*Ключевые слова:* энтерококки, санитарная микробиология, психрофильные микроорганизмы.

**А**нтропогенное загрязнение, в том числе и в сложных экологических условиях, является одной из наиболее актуальных проблем современного экологического мониторинга. Проблема оптимизации антропогенной среды населения Дальневосточного региона основана на решении таких этапов, определяющих улучшение гигиенических аспектов пребывания населения в сложных экологических условиях, как контроль воды, предназначенной для питья, продуктов питания, в том числе приготовленных и с применением сырья водного происхождения (гидробионтов). В данном случае идентификация санитарно-значимых микроорганизмов и проведение микробиологическо-

го мониторинга становятся особенно важным. Одним из наиболее важных условий для разработки превентивных мер и предотвращения распространения возбудителей инфекционных заболеваний является своевременное обнаружение микробной контаминации воды и других объектов окружающей среды, потенциально являющихся эпидемически значимыми факторами. Необходимо отметить, что микробиологические исследования являются более чувствительными индикаторами загрязнения воды при сравнении с химическими методами санитарного мониторинга. При этом, санитарно-микробиологический мониторинг включает два аспекта, среди которых оценка общего уровня ми-

кробного загрязнения и количественный учет санитарно-показательных микроорганизмов, что, собственно, и позволяет получить более достоверные сведения о возможном антропогенном загрязнении окружающей среды, а также позволяет получить количественные данные о выявлении санитарно-показательных микроорганизмов, являющихся индикаторными для характеристики той или иной исследуемой среды. При этом, важность изучения распространения санитарно-показательных микроорганизмов является особенно значимой, и вместе с тем, определяет проблему оптимизации в выборе методов оценки антропогенного загрязнения окружающей среды, так как требует оптимизации методик идентификации и дальнейшего изучения их свойств.

Бактерии рода *Enterococcus* являются одними из самых распространенных и выявляются в составе микробиоценозов многих экосистем, так как представлены в нормальной микрофлоре человека и животных, а также могут выявляться в воде, различных пищевых продуктах, могут быть также выявлены в объектах окружающей среды, таких как растения, животные, птицы и насекомые. Применение штаммов семейства *Enterococcus* в качестве санитарно-показательного микроорганизма было впервые предложено М. Хаустоном в 1910 году, на основании того, что энтерококки постоянно находятся в кишечном тракте человека, несмотря на то, что эти бактерии не могут размножаться во внешней среде, а также на том, что энтерококки сравнительно легко выявить, так как не проявляют изменчивости и не имеют аналогов во внешней среде. Особенностью применения энтерококков в качестве санитарно-показательного микроорганизма является и то, что они являются чрезвычайно устойчивыми к высоким концентрациям солей (при исследовании морской воды), а также тем, что энтерококки чрезвычайно устойчивы к колебаниям pH, что дает возможность применять энтерококки как санитарно-показательного микроорганизма как в кислых, так и в щелочных продуктах. Вместе с тем, доказано, что энтерококки в качестве оппортунистической микрофлоры могут вызвать инфекционно-воспалительные заболевания животных и человека: эндокардиты маститов, метриты и сепсис новорожденных [1]. При видовой характеристике энтерококков, выделенных из различных источников, можно отметить, что *E. faecium* и *E. faecalis* являются наиболее часто встречающимися энтерококкам желудочно-кишечного тракта человека, при этом, *E. faecium* выявляется в результате жизнедеятельности животных, а *E. mundtii* и *E. casseliflavus* выявляются как биомаркер растительных остатков. Экологические и эпидемиологические исследования показывают, что *E. faecalis* и *E. faecium* периодически идентифицируются помимо почвы и воды, в пище- сыре, рыбе, мясе. Пищевые продукты- такие как

сосиски и сыр — часто контаминируются штаммами энтерококков, так как они способны выживать при нагревании.

Идентификация энтерококков как одного из санитарно-показательных микроорганизмов является достаточно распространенной при оценке санитарного состояния водных объектов, в том числе и для характеристики питьевой воды, технических и сточных вод. При этом, некоторые исследователи считают, что энтерококки являются одним из наиболее чувствительных микроорганизмов, идентифицирующих фекальное загрязнение, в особенности по сравнению с кишечной палочкой, так как энтерококк не размножается вне организма человека или животных [2]. Данная точка зрения нашла отражение в общепринятых в настоящее время Международном и Европейском стандартах исследования питьевой воды, включенных в том числе и в рекомендации Всемирной Организации здравоохранения. Однако, чем больше накапливается данных о применении энтерококков в качестве санитарно-показательного микроорганизма, становится очевидным, что протокол идентификации данных бактерий требует оптимизации, так как чувствительность и специфичность применяемого в настоящее время протокола микробиологического исследования не позволяет идентифицировать наличие штаммов энтерококков в пробах воды, полученных из водных объектов с различными микрoэкологическими характеристиками. Классическим методом, и общепринятым среди многих, является микробиологическое исследование с использованием таких сред как стандартный метод определения энтерококков (таких видов как *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum*), основанный на высеве определенного количества продукта, или его разведения в жидкую селективную среду, или на поверхность плотной селективной среды, аэробном культивировании посевов при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24–48 ч, подтверждении принадлежности выросших микроорганизмов к энтерококкам, пересчете их количества на 1 г (1 см<sup>3</sup>) продукта. Предлагаемые среды, такие как азидно-глюкозный бульон, селективный агар по Сланцу и Бертли, канамицинэскулин азид агар. [3–6,8] Однако, применение данных сред дает по мнению ряда специалистов противоречивые результаты в чувствительности и специфичности микробиологического исследования на энтерококки в зависимости от микрoэкологической ситуации. Таким образом, энтерококки, выделяющиеся из желудочно-кишечного тракта теплокровных животных, обнаруживаются в пресноводных, так и в морских водных объектах. Другой проблемой при применении энтерококков в качестве санитарно-показательного микроорганизма считают инсоляцию. При этом, солнечный свет считается стрессовым фактором с 1877 года. Большинство механизмов воздействия солнечного света разрушительны для микроорганизмов

путем прямого действия ультрафиолетового излучения на ДНК микроорганизма, а также формирования эндогенных и экзогенных штаммов, реактивных к кислороду — впервые влияние ультрафиолетового излучения на ДНК микроорганизмов, в том числе и на штаммы санитарно-показательных микроорганизмов, таких как энтерококки, еще в 1929 году, предопределив изучение бактерицидного эффекта ультрафиолетового излучения на микробиоценоз. Кроме того, выявлены различия в выраженности бактерицидного эффекта на популяцию микроорганизмов в соленой и в пресной воде, а также выявление взаимосвязи с температурой и с содержанием органических веществ, содержанием кислорода, мутности, глубины и наличия течений. Глубина и мутность водного объекта обратно пропорциональны эффективности действия солнечного излучения. Оба фактора позитивно коррелировали с абсорбцией света, что, в конечном итоге, определяет бактерицидный эффект, и соответственно, возможность идентификации штаммов *Enterococcaceae* и применения их в качестве санитарно-индикаторных микроорганизмов. Способность энтерококков расти в присутствии солей (к примеру, в концентрации 6,5% хлорида натрия) является одной и отличительных особенностей рода энтерококков. Таким образом, чем более выражена толерантность энтерококков к содержанию солей по сравнению с другими микроорганизмами, тем более пригодными являются данные микроорганизмы для применения в качестве санитарно-показательных. В отношении влияния почвы на развитие микробиоценоза, и определения роли в них энтерококков, некоторые исследователи считают, что уровень выживания штаммов энтерококков в почве зависит от температурных условий в том числе: он выше в почвах зимой и весной, но ниже летом и осенью, хотя общепринятой точкой зрения считается, что изучать распространение энтерококков в качестве санитарно-показательных микроорганизмов необходимо исключительно при температуре выше +20 градусов Цельсия.

Таким образом, микрoэкологическая ситуация может определяться целым рядом факторов, определяющих состав микробиоценоза в тех или иных объектах окружающей среды, и определяющих, соответственно, вероятность выделения штаммов энтерококков для индикации микроорганизмов в качестве санитарно-показательных. Среди таких факторов выделяют прежде всего температуру, что в особых микрoэкологических условиях, определяемых в том числе и геоклиматическими особенностями, оказывает значительное влияние на выделение микроорганизма, и, соответственно, определяет чувствительность и специфичность применения идентификации штаммов энтерококков как санитарно-показательного микроорганизма. В связи с этим, существует объективная необходимость оптимизации протокола

идентификации энтерококков в объектах окружающей среды с целью стандартизации его для в условиях применения различных климатических условий.

Цель: оптимизировать протокол микробиологического исследования при идентификации штаммов энтерококков и изучении проб воды с различными микрoэкологическими характеристиками для рационализации применения штаммов энтерококков в качестве санитарно-показательного микроорганизма.

Материалы и методы: нами были изучены пробы воды, полученные из бухты Золотой Рог (Корабельная набережная), взятые в условиях пониженной температуры (-11 °C воздуха и 1.4 °C воды), в объеме 10 мкл и 20 мкл. Бактериологическое исследование проводилось согласно методике, описанной в литературе. [7,9,10]

Результаты: для оптимизации протокола бактериологического исследования проб воды, выделенных при пониженных температурах (-11 °C и 1.4 °C воды), что является экстремальной ситуацией для энтерококков и осложняет их применение в качестве санитарно-показательного микроорганизма в зимних условиях, нами было предложено оптимизировать используемую среду для выделения энтерококков путем добавления различных концентраций дрожжевого экстракта (производитель Франция). В результате нами было выяснено, что при увеличении объема пробы и концентрации дрожжевого экстракта, количество выделенных колоний энтерококков увеличивается, при этом инкубация проб в сроки до 48 часов, увеличивает вероятность выделения штаммов энтерококков. При этом, при изучении пробы в 10 мкл и концентрации дрожжевого экстракта в 1 мкг/мл при инкубации в течение 1 суток было идентифицировано 14 колоний, количество колоний из этой же пробы объемом в 10 мкл и при концентрации дрожжевого экстракта в 1 мкг/мл через 48 часов составило 16 колоний. Аналогичная ситуация наблюдалась и при изучении 20 мкл: при инкубации с концентрацией дрожжевого экстракта в 1 мкг/мл количество колоний составило 170 колоний, а при инкубации в течении 48 часов 176 колоний.

Выводы и заключение: применение дрожжевого экстракта в качестве ростового фактора для выделения энтерококков позволяет оптимизировать протокол идентификации энтерококков в микробиологическом исследовании с целью изучения распространения штаммов энтерококков как санитарно-показательных микроорганизмов водных объектах с различными микрoэкологическими условиями, в том числе в пробах, взятых при пониженной температуре, что позволяет шире применять штаммы энтерококков в качестве санитарно-показательных микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красная Ю. В., Нестеров А. С., Потатуркина-Нестерова Н. И. Значение бактерий рода *Enterococcus* в жизнедеятельности человека // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 3. С. 1169–1178.
2. Поздеев, под ред. В. И. Покровского. О. К. Медицинская микробиология: учебное пособие. Москва: ГЭОТАР — Медиа. 2010. 4-е изд., 768 с.
3. Mo'ati Abed El., K. El Jarousha., Influence of seasonal environmental variables on the distribution of fecal indicator bacteria in seawater of gaza strip // Annals of Alquds Medicine 2006. Vol. 2 Issue. 1. P. 18–24.
4. Тарас В. А., Фурик Н. Н., Жабанос Н. К. Изучение влияния дрожжевого экстракта на развитие бифидобактерий разных видов // «Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья». 2016. № 10. С. 113–121.
5. Ноллет Л. М. Л., Лин С. П. Де Гелдер. Анализ воды: справочник пер. с англ. яз. под ред. И. А. Васильевой, Е. Л. Пролетарской. Санкт-Петербург: Профессия. 2012. 2 изд. 919 с.
6. Колычев Н. М., Петрова М. И., Егорова А. С. Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды из разводящей сети децентрализованных водоисточников животноводческих ферм Омской области // Вестник Омского государственного аграрного университета. 2011. № 3(3). С. 72–75.
7. Шевченко Л. В., Бадеева Ш. М., Самсоненко А. А. Индикация и идентификация энтерококков. // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2014. № 47. С. 140–142.
8. Скворцова В. В., Дмитраченко Т. И., Зенькова С. К., Жильцов И. В. Клинико-микробиологические аспекты применения бета-лактамов антибиотиков при пневмококковой инфекции // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2005. Т. 4. № 1. С. 98–102.
9. Паныков А. С. Прогнозирование постгриппозных осложнений с учетом вирусно-бактериальных ассоциаций // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2012. № 6(67). С. 21–15.
10. Шевченко Л. В., Баженова Е. А., Бадеева Ш. М. Энтерококки, Антибиотикорезистентность и антибиотикочувствительность // Ветеринария и кормление. 2013. № 5. С. 61.

© Мартынова Алина Викторовна (clinmicro@yandex.ru), Слабенко Эллада Владимировна (elladaslabenko@mail.ru),

Сингур Ольга Александровна (Olga.singour@mail.ru), Лобова Татьяна Геннадьевна (Lobova@mail.ru),

Семигласова Виктория Валерьевна (Vikkisemi@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Дальневосточный Федеральный Университет