

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПИТЬЕВОЙ ВОДОПРОВОДНОЙ ВОДЫ УСТОЙЧИВЫХ К ГИПОХЛОРИТУ НАТРИЯ

И.Ю. Рой, Н.А. Клименко, Г.М. Здоровенко, В. В. Гончарук

Институт коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского НАН Украины, г. Киев  
[roy\\_inka@ukr.net](mailto:roy_inka@ukr.net)

*Изучены морфолого-культуральные особенности трех доминирующих бактериальных культур, изолированных из питьевой водопроводной воды и проб воды, отобранной на различных этапах ее доочистки на установке водоподготовки предприятия специальных напитков. По последовательностям гена 16S рРНК идентифицированы следующие виды бактерий: *Bacillus nanhaiensis*, *Brevibacterium frigoritolerans* и *Lysinibacillus fusiformis*. Установлено, что наиболее резистентным к хлору оказался *Lysinibacillus fusiformis*. Его устойчивость к гипохлориту натрия ( $\text{NaClO}$ ) при концентрациях 1,4; 3; 5; и 7 мг/дм<sup>3</sup> варьирует в пределах 1 – 98 % при продолжительности экспозиции от 5 до 60 мин, в то время как остальные два изолята *Bacillus nanhaiensis* и *Brevibacterium frigoritolerans* продемонстрировали низкую выживаемость в присутствии  $\text{NaClO}$  (0 – 16%). Проведена параллель между морфологическим типом выделенных бактериальных изолятов, их способностью образовывать пелликулу в интерфазе жидкость/воздух и устойчивостью к хлору. Такая стойкость к достаточно высоким концентрациям гипохлорита натрия может развиваться в результате естественного отбора посредством случайных мутаций и/или благодаря воздействию самого дезинфектанта, который может индуцировать возникновение приобретенной устойчивости.*

*Ключевые слова: бактериальная биопленка, резистентность, гипохлорит натрия, *Bacillus nanhaiensis*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Lysinibacillus fusiformis*.*

### Введение

Доочистка водопроводной воды для нужд производства на предприятиях пищевой промышленности является распространенной практикой. Одной из главных проблем в таких системах очистки являются микробные загрязнения, присутствующие либо в исходной воде, либо вносимые в очищаемую воду при ее обработке. При фильтровании воды через слой песка и активного угля (АУ) важную роль играет бактериальная биопленка [1]. Для клеток, интегрированных в биопленку, характерна плотная упаковка, которая способствует передаче межклеточных сигналов, а также процессу естественного обмена генетической информацией [2]. Скоординированная активность сообщества микробов делает биопленки малоуязвимыми для действия дезинфектантов. Как теперь установлено, биопленки являются одним из патогенетических факторов формирования хронических инфекционных процессов [3].

Известный микробиолог и эпидемиолог США Timothy Edgcumbe Ford [4] констатирует множественную резистентность к антибиотикам у патогенных бактерий, передающихся водным путем, и считает недостаточно исследованной областью знаний перенос генов антибиотикорезистентности и устойчивости к хлору в биопленках систем водоснабжения.

Резистентность микроорганизмов — это полная или частичная невосприимчивость к противомикробным препаратам (антибиотикам, дезинфектантам т. д.). Может достигаться за счёт биосинтеза микроорганизмом ферментов, инактивирующих биоцид, либо таким изменением структуры соединений-мишеней, атакуемых дезинфектантами, при котором микроорганизм мог бы продолжать свою жизнедеятельность в присутствии антимикробного препарата [5].

В последние годы акцентируется внимание на формировании незначительной фракции бактерий в биопленке, так называемых “стойких бактерий”, для которых характерна чрезвычайно высокая резистентность [6]. Показано, что персистеры в значительной степени ответственны за трудности излечения инфекций (порядка 60%), источником которых являются бактериальные биопленки [7].

В комментарии к механизмам устойчивости, ассоциированным с биопленками, возрастание резистентности к антисептикам и дезинфектантам авторы [8] объясняют переносом плазмид между бактериями в биопленке. При этом устойчивость подразделяется на: а) исходную (природную, свойственную /intrinsic/); б) приобретенную вследствие мутаций; в) передающуюся плазмидами как носителями внехромосомной ДНК (самомультиплицирование /self-replicating/); г) передающуюся транспозонами (хромосомными или интегрированными плазмидами как носителями генных кассет). Плазмиды и транспозоны как автономные генетические элементы или мобильные генетические носители проводят гены между отдаленными по родству микроорганизмами, что лежит в основе горизонтальной (или латеральной) генной передачи.

Существующие в настоящее время теоретические и экспериментальные предпосылки свидетельствуют о единстве природы резистентности, которая за последние десятилетия развивалась как интегральная устойчивость к биоцидам как антимикробным средствам. В этой многозвеньевой структуре вода является идеальной средой для формирования субстратов (биопленок), обеспечивающих персистентность и мультивариантность резистентности бактерий [9].

В работе [10] была исследована микрофлора общественных питьевых водопроводных вод из семнадцати различных городов между истоками реки Арканзас и устьем реки Миссисипи. Почти 98% последовательностей, наблюдаемых среди всех систем, разделились на пять филумов: *Proteobacteria* (35%), *Cyanobacteria* (29%), *Actinobacteria* (24%, из которых 85% *Mycobacterium spp.*), *Firmicutes* (6%) и *Bacteroidetes* (3,4%). В [11] была исследована также динамика бактериальных сообществ каждого этапа очистки питьевой воды на сооружениях водоподготовки в Китае. Доминирующим филумом с точки зрения среднего изобилия во всех образцах являлся *Proteobacteria* (47,1%), затем *Bacteroidetes* (12,1%), *Actinobacteria* (11,2%), *Cyanobacteria* (10,7%) и *Chloroflexi* (5,8%), в то время как *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Thermotogae* и *Verrucomicrobia* представлены в незначительном количестве.

Отдельные бактериальные сообщества были обнаружены на всех этапах системы водоподготовки. Вполне вероятно, что конкретные операции, используемые в системах подготовки питьевой воды, по-разному влияют на бактериальный состав [12,13]. В целом детальный анализ динамики бактериальных сообществ всего процесса водоподготовки показал, что фильтрование через песчаный фильтр и хлорирование были самыми эффективными в снижении разнообразия водных и биопленочных сообществ [12–14].

Авторами [10–13,15,16] были обнаружены общие сходства среди микробного разнообразия многочисленных систем водоподготовки. Это свидетельствует о том, что дезинфекция и распределительные системы воды имеют большее влияние на микрофлору в пунктах использования, чем географическое расположение, качество или тип исходной воды. Таким образом, сходство базовой микрофлоры систем предполагает, что системы водоочистки и распределения питьевой воды являются селективными средами для определенного вида микробиоценоза.

Цель данной работы – выделение индивидуальных культур бактерий из питьевой водопроводной воды и проб этой же воды, отобранной на различных этапах ее доочистки; изучение культурально-морфологических свойств, устойчивости по отношению к NaClO как основному средству обеззараживания воды; определение видового состава исследуемых микроорганизмов по последовательностям гена *16S* рРНК с использованием методов молекулярной биологии на основе филогенетического анализа.

### Методика эксперимента

В работе исследовали пробы питьевой водопроводной воды, а также пробы этой же воды, отобранной на различных этапах ее очистки с помощью установки водоподготовки предприятия специальных напитков. Вода, которая прошла все стадии подготовки и доочистки, является исходным сырьем при производстве специальных напитков. В систему водоподготовки она поступала из городского водопровода и соответствовала нормативным требованиям к питьевой воде (ДСанПиН 2.2.4-400-10 [17]). С целью доочистки ее пропускали через систему очистительных устройств, состоящих из резервуаров-накопителей водопроводной воды, песчаных фильтров, угольных фильтров, дегазатора, буферных резервуаров очищенной воды. Для предупреждения развития нежелательной микрофлоры в технологии водоподготовки предусмотрено обеззараживание воды и дезинфекция оборудования, которые проводят в трех точках: резервуарах-накопителях, перед песчаными фильтрами и в буферных резервуарах. Обеззараживание осуществляли гипохлоритом натрия ( $\text{NaClO}$ ). Считается, что одним из наиболее эффективных средств по удалению биопленки является раствор  $\text{NaClO}$ , который способен растворять органический экстрацеллюлярный матрикс биопленки, проникая в глубокие слои бактериальных конгломератов [18]. Дозы  $\text{NaClO}$  составляли: в точке 1 – в количестве, необходимом для обеспечения концентрации свободного хлора на уровне  $0,4 - 0,5 \text{ мг/дм}^3$ ; в точке 2 – доведение содержания свободного хлора до  $0,9 \text{ мг/дм}^3$ ; в точке 3 – обеспечение остаточной концентрации свободного хлора  $0,04 \text{ мг/дм}^3$ . Дезинфекцию оборудования проводят 2 % - ным раствором гипохлорита натрия.

Исследуемые образцы воды были стерильно отобраны со следующих этапов очистки: питьевая вода из городского водопровода, вода из накопительных резервуаров, после песчаного фильтра, после угольного фильтра, после Н-катионитовых фильтров, после дегазатора и очищенная вода из буферных резервуаров. Бактерии выделяли методом мембранной фильтрации. По  $100 \text{ см}^3$  исследуемой воды фильтровали через стерильные фильтры для микробиологических целей EZPAK036, которые помещали на чашки Петри с мясо-пептонным агаром (МПА), инкубировали при температуре  $(28 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$  в течение  $(48 \pm 2) \text{ ч}$ . Для получения изолированных колоний чистых культур выделенных микроорганизмов использовали метод секторного посева по Gold [19].

Изучали характер роста выделенных бактерий на жидкой (мясо-пептонный бульон (МПБ)), и твердой (мясо-пептонный агар (МПА)) питательных средах.

Далее определяли устойчивость выделенных нами чистых культур бактерий по отношению к  $\text{NaClO}$ . Показатель устойчивости к хлору микроорганизмов, которые колонизируют системы питьевой воды, является важным для оценки качества получаемой воды. При проведении анализа использовали суточные культуры бактерий. Микробную массу смывали  $50 \text{ см}^3$  стерильной питьевой водопроводной воды, используемой на производстве для доочистки. Смывы встряхивали на аппарате Шуттеля в течение 30 – 40 мин. Полученную однородную микробную суспензию стандартизировали по стандарту мутности до 5 единиц ( $0,5 \text{ млрд/1 см}^3$ ). Далее готовили серию разведений и доводили плотность исследуемой суспензии микробных клеток до  $5 \cdot 10^4/\text{см}^3$  (оптимальная плотность суспензии микробных клеток для визуального подсчета колонийобразующих единиц, КОЕ). В качестве контроля  $0,1 \text{ см}^3$  каждой разведенной микробной суспензии сеяли на чашки Петри с МПА (поверхностный метод), инкубировали при температуре  $(28 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$  в течение  $(48 \pm 2) \text{ ч}$ . Для определения устойчивости к хлору к 1 мл каждой разведенной микробной суспензии добавляли раствор  $\text{NaClO}$  в следующих концентрациях: 1,4; 3; 5; 7 мг/л. Инкубировали 5, 10, 20 и 60 мин при  $(28 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ . Далее отбирали по 0,1 мл каждой испытуемой микробной суспензии и поверхностным методом высевали на чашки Петри с МПА, инкубировали при  $(28 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$  в течение  $(48 \pm 2) \text{ ч}$ . Через двое суток подсчитывали КОЕ, сравнивая количество выживших бактериальных клеток с контролем, а также рассчитывали количество бактерий, чувствительных и нечувствительных по отношению к  $\text{NaClO}$ .

Определяли таксономический статус исследуемых микроорганизмов по последовательностям гена *16S* рРНК с использованием методов молекулярной биологии на основе филогенетического анализа.

Генетическую идентификацию проводили в несколько этапов: выделение ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР) гена *16S* рРНК, секвенирование ПЦР-продуктов, анализ последовательностей *16S* рРНК.

**Выделение ДНК** из биомассы бактерий проводили при помощи метода, описанного в [20]. Концентрация полученного препарата ДНК при использовании этого метода составляла 30 – 50 мкг/см<sup>3</sup>. Согласно данным электрофоретического анализа РНК в полученном препарате присутствует в следовых количествах (< 1%).

**ПЦР гена *16S* рРНК.** Для проведения полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена *16S* рРНК была использована универсальная праймерная система [21]. Объем амплификационной смеси составлял 50 мкдм<sup>3</sup> и имел следующий состав: 1<sup>x</sup> буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 67 мМ трис-НСl, рН 8,8, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>); по 12,5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq ("Диалат ЛТД", Россия).

Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл – 94°С при 9 мин, 55°С при 1 мин, 72°С при 2 мин; последующие 30 циклов – 94°С при 1 мин, 55°С при 1 мин, 72°С при 2 мин; завершающий цикл – 72°С при 7 мин. Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 2%-ном геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см.

Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps ("Promega", США) согласно рекомендациям производителя.

**Секвенирование ПЦР-продуктов.** Секвенирование полученных ПЦР-фрагментов генов, кодирующих *16S* рРНК, проводили по методу описанному в [22] с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 ("Applied Biosystems", Inc.,USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 ("Applied Biosystems", Inc.,USA) согласно инструкциям производителя. При этом для секвенирования использовали праймеры [21] и чтение проводили в двух направлениях.

**Анализ последовательностей *16S* рРНК.** Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов *16S* рРНК изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST [23].

### **Результаты и их обсуждение**

Получены изоляты доминирующих бактериальных культур из различных типов колоний, выявленных в пробах питьевой водопроводной воды и пробах воды, отобранной на разных этапах очистки установки водоподготовки предприятия специальных напитков методом мембранного фильтрования. Данные микроорганизмы прошли все стадии очистки установки водоподготовки в условиях периодической дезинфекции фильтров гипохлоритом натрия и тепловой обработки. Изучаемые культуры были обозначены "V", "O", "W".

Две бактериальные культуры "V", "O" представлены круглыми слизистыми колониями S-типа. Изолят "W" имеет неправильную форму, ругозный тип поверхности, более крупные размеры. При изучении характера роста бактерий на жидкой питательной среде обнаружено, что только культура "W" образует плотную морщинистую пленку в интерфазе жидкость/воздух, что, согласно [24,25] может свидетельствовать о более эффективной способности бактерии формировать фиксированную на поверхности биопленку.

При изучении чувствительности выделенных бактерий к NaClO выявлено, что их выживаемость варьирует в диапазоне 0,18 – 98 % (табл. 1). Наиболее резистентными к хлору оказались бактерии образца "W", их устойчивость к NaClO при концентрациях 1,4; 3; 5; и 7 мг/дм<sup>3</sup> варьирует в диапазоне 1 – 98 % при продолжительности экспозиции от 5 до 60 мин, в то время как изоляты "V" и "O" продемонстрировали низкую выживаемость в присутствии гипохлорита натрия (0 – 16%). Установлено, что ругозность бактериальных колоний связана с более высокой их выживаемостью в хлорированной воде по сравнению с гладкими формами бактерий и коррелирует со способностью формировать биопленку [26,27]. На основании полученных данных можно провести определенную параллель между морфологическим типом колоний бактериальных изолятов "V", "O", "W", их способностью образовывать пелликулу в интерфазе жидкость/воздух и устойчивостью к хлору. Среди изученных нами культур только изолят "W" образовывал плотную хорошо структурированную пелликулу, что характерно для бактерий, способных формировать биопленку и показал высокую резистентность по отношению к хлору. Как видно из табл. 1, изолят "W" проявлял высокую устойчивость (1 – 84%) даже при таких значениях концентраций NaClO как 5 и 7 мг/дм<sup>3</sup>. Такая стойкость к достаточно высоким концентрациям гипохлорита натрия может развиваться в результате естественного отбора посредством случайных мутаций и/или благодаря воздействию самого дезинфектанта. Микроорганизмы способны переносить генетическую информацию устойчивости к биоцидам путём горизонтального переноса генов [5, 8]. Следовательно, приобретенная устойчивость дает возможность отдельным штаммам бактерий сохранять жизнеспособность при тех концентрациях биоцида, которые подавляют основную часть микробной популяции, консорциума бактериальных клеток. Возможны ситуации, когда большая часть микробной популяции проявляет приобретенную устойчивость. Появление у бактерий приобретенной резистентности не обязательно сопровождается снижением бактерицидной эффективности дезинфицирующего средства. Формирование резистентности во всех случаях обусловлено генетически: приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов [28].

Наиболее распространенным механизмом устойчивости микроорганизмов является локализация кодирующих генов (плазмидная или хромосомная). Эта характеристика определяет эпидемиологию резистентности. При плазмидной локализации генов происходит быстрое внутри - и межвидовое распространение устойчивости, при хромосомной - наблюдают распространение резистентного клона [29].

Из выше изложенного можно сделать предположение, что выделенный нами изолят "W", который проявил самую высокую устойчивость к хлору, среди остальных бактериальных изолятов "V" и "O" имеет приобретенную устойчивость к гипохлориту натрия при плазмидной локализации кодирующих генов.

Рассмотренная в данной работе проблема резистентности бактерий к хлору, как основному средству обеззараживания воды, которую мы попытались охарактеризовать, имеет конкретную прикладную направленность. Решение этого вопроса может быть основанием необходимости использования более эффективных технологий обеззараживания воды и/или комбинирования хлора с другими дезинфектантами.

Проведена генетическая идентификация бактериальных культур "V", "O", "W". Для всех исследуемых образцов определена практически полная последовательность нуклеотидов амплификата гена, кодирующего 16S рРНК по номенклатуре *Escherichia coli*. Для бактериального изолята "O" была определена практически полная последовательность (1495 нуклеотидов) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК, что соответствует позициям с 16 по 1517. Далее были проанализированы полученные последовательности путем сравнения с аналогичными в базе данных GenBank [23]. Следует отметить, что филогенетически наиболее близкими к исследованному образцу "O" являлись *Bacillus panhaiensis* и *Bacillus arsenicus*. Уровень сходства последовательностей исследуемого образца со штаммами *Bacillus panhaiensis* strain K-W9 (JQ799063) и *Bacillus arsenicus* strain

B3 (GQ304784) составил, соответственно, 100 и 99,9%. Уровень сходства последовательностей указанного образца и типового штамма *Bacillus nanhaiensis* strain JSM 082006 (GU477780) составил 100, а уровень сходства с типовым штаммом *Bacillus arsenicus* strain con a/3 (AJ606700) – 97,4%. По существующим в настоящее время представлениям [30], обнаруженный уровень сходства последовательностей 16S рНК позволяет отнести изучаемый штамм "O" к виду *Bacillus nanhaiensis*.

Для исследуемого штамма "V" определена последовательность (1439 нуклеотидов) амплификата гена, кодирующего 16S рНК, что соответствует позициям с 40 по 1490. Также был проведен анализ полученной последовательности путем сравнения с аналогичными последовательностями, помещенными в базу данных GenBank [23]. Выявлено, что филогенетически наиболее близкими к образцу "V" являлись виды бактерий [*Brevibacterium*] *frigoritolerans*, *Bacillus simplex* и *Bacillus megaterium*. Уровень сходства последовательностей исследуемого образца со штаммами [*Brevibacterium*] *frigoritolerans* strain DSM 8801 (NR\_042639), *Bacillus simplex* strain WN579 (DQ275178) и *Bacillus megaterium* strain NBRC 12068 (AB680229) составил, соответственно 100, 100 и 99,9%. Уровень сходства последовательностей бактериального изолята "V" с типовыми штаммами [*Brevibacterium*] *frigoritolerans* strain 8801T (AM747813), *Bacillus simplex* strain DSM 1321T (AJ439078) и *Bacillus megaterium* strain IAM 13418 (D16273) составил, соответственно, 100, 99,5 и 94,8%. По существующим в настоящее время представлениям [30], обнаруженный уровень сходства последовательностей 16S рНК позволяет отнести бактериальную культуру "V" к штамму вида [*Brevibacterium*] *frigoritolerans*.

Для образца "W", который показал высокую устойчивость к концентрациям NaClO – 1,4; 3; 5; и 7 мг/дм<sup>3</sup> в пределах 1 – 98 %, также была определена практически полная последовательность (1493 нуклеотида) амплификата гена, кодирующего 16S рНК, что соответствует позициям с 20 по 1518. Проведен анализ полученной последовательности путем сравнения с аналогичными последовательностями, помещенными в базу данных GenBank [23]. Из полученных данных следует, что филогенетически наиболее близкими к исследованному образцу "W", были виды бактерий *Lysinibacillus fusiformis* и *Lysinibacillus sphaericus*. Уровень сходства последовательностей данного образца со штаммами *Lysinibacillus fusiformis* strain DSM 2898 (NR\_042072) и *Lysinibacillus sphaericus* strain SEP-1 (KF228905) составил, соответственно, 100 и 99,8%. Уровень сходства последовательностей образца "W" и типового штамма *Lysinibacillus fusiformis* strain NRS-350 (AF169537) составил 99,7, а уровень сходства с типовым штаммом *Lysinibacillus sphaericus* strain B-23268 (AF169495) – 98,4%. По существующим данным [30], обнаруженный уровень сходства последовательностей 16S рНК позволяет отнести образец "W" к виду *Lysinibacillus fusiformis*.

Детальная характеристика идентифицированных бактериальных культур описана в [31].

Таблица 1. Чувствительность выделенных бактериальных культур по отношению к хлору

Культура	Доза NaClO, мг/дм <sup>3</sup>	Продолжительность экспозиции с NaOCl, мин									
		5		10		20		60			
		устойчивых к NaClO	чувствительных к NaClO	устойчивых к NaClO	чувствительных к NaClO	устойчивых к NaClO	чувствительных к NaClO	устойчивых к NaClO	чувствительных к NaClO	устойчивых к NaClO	чувствительных к NaClO
<b>V</b>	1,4	16	84	12	88	10	90	11	89		
	3	2	98	0	100	0	100	1	99		
	5	4	96	4	96	1	99	2	98		
	7	4	96	0	100	1	99	1	99		
<b>O</b>	1,4	13,50	86,5	8,7	91,3	0	100	0	100		
	3	7,46	92,54	5,15	94,85	0	100	0	100		
	5	0,18	99,82	5,33	94,67	0	100	0,18	99,82		
	7	4,80	95,2	0,53	99,47	0	100	0	100		
<b>W</b>	1,4	–	–	85	15	96	4	78	22		
	3	24	76	81	19	98	2	3	97		
	5	84	16	74	26	46	54	1	99		
	7	72	28	68	32	39	61	4	96		

## **Выводы**

Изучены морфолого-культуральные особенности трех доминирующих бактериальных культур, изолированных из питьевой водопроводной воды и этой же воды, отобранной на различных этапах ее доочистки на установке водоподготовки предприятия специальных напитков. Проанализирован видовой состав выделенных бактериальных изолятов по последовательностям гена 16S рРНК. Идентифицированы следующие виды бактерий: *Bacillus nanhaiensis*, *Brevibacterium frigoritolerans* и *Lysinibacillus fusiformis*. Установлено, что наиболее резистентным к хлору оказался *Lysinibacillus fusiformis*, его устойчивость к NaClO при концентрациях 1,4; 3; 5; и 7 мг/дм<sup>3</sup> варьирует в пределах 1 – 98 % при продолжительности экспозиции от 5 до 60 мин, в то время как остальные два изолята *Bacillus nanhaiensis* и *Brevibacterium frigoritolerans* продемонстрировали низкую выживаемость в присутствии NaClO (0 – 16%). Проведена параллель между морфологическим типом бактериальных изолятов, их способностью образовывать пелликулу в интерфазе жидкость/воздух и устойчивостью к хлору. Сделано предположение, что стойкость к достаточно высоким концентрациям NaClO развивается в результате естественного отбора посредством случайных мутаций и/или благодаря воздействию самого дезинфектанта, который может индуцировать возникновение приобретенной устойчивости.

## **ВИЗНАЧЕННЯ ВИДОВОЇ ПРИНАЛЕЖНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ПИТНОЇ ВОДОПРОВІДНОЇ ВОДИ СТІЙКИХ ДО ГІПОХЛОРИТУ НАТРІЮ**

**І.Ю. Рой, Н.А.Клименко, Г.М. Здорovenko, В.В. Гончарук**

Інститут колоїдної хімії і хімії води ім. А. В. Думанського НАН України, м. Київ  
[roy\\_inka@ukr.net](mailto:roy_inka@ukr.net)

*Вивчено морфолого-культуральні особливості трьох домінуючих бактеріальних культур, ізольованих з питної водопровідної води і проб води, відібраної на різних етапах її доочистки на установці водопідготовки підприємства спеціальних напоїв. За послідовностями гена 16S рРНК ідентифіковані наступні види бактерій: *Bacillus nanhaiensis*, *Brevibacterium frigoritolerans* і *Lysinibacillus fusiformis*. Встановлено, що найбільш резистентним до хлору виявився *Lysinibacillus fusiformis*. Його стійкість до гіпохлориту натрію (NaClO) при концентраціях 1,4; 3; 5; і 7 мг/дм<sup>3</sup> варіює в межах 1 - 98% при тривалості експозиції від 5 до 60 хв, у той час як інші два ізоляти *Bacillus nanhaiensis* і *Brevibacterium frigoritolerans* продемонстрували низьку стійкість у присутності NaClO (0 - 16%). Проведена паралель між морфологічним типом виділених бактеріальних ізолятів, їх здатністю утворювати пелікулу в інтерфазі рідина / повітря і стійкістю до хлору. Така стійкість до досить високих концентрацій гіпохлориту натрію може розвиватися в результаті природного відбору за допомогою випадкових мутацій і / або завдяки впливу самого дезінфектанта, який може індукувати виникнення набутої стійкості.*

*Ключові слова: бактеріальна біоплівка, резистентність, гіпохлорит натрію, *Bacillus nanhaiensis*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Lysinibacillus fusiformis*.*

## **IDENTIFICATION OF MICROORGANISM DRINKING TAP WATER RESISTANT SODIUM HYPOCHLORITE**

**I.Y Roi, N.A Klimenko, G.M. Zdorovenko, V.V. Goncharuk**

Institute of Colloid and Water Chemistry named Dumansky NAS , Kiev  
[roy\\_inka@ukr.net](mailto:roy_inka@ukr.net)

*The morphological and cultural characteristics of the three dominant bacterial cultures isolated from drinking tap water and water samples at different stages of post-treatment on the installation of water treatment companies of special drinks were studied. From the sequence of the*



*16S rRNA gene identified the following types of bacteria: Bacillus nanhaiensis, Brevibacterium frigoritolerans and Lysinibacillus fusiformis. It was found that the most resistant to chlorine appeared Lysinibacillus fusiformis. Its resistance to sodium hypochlorite (NaClO) at concentrations of 1.4; 3; 5; and 7 mg / l varies from 1 - 98%, while the duration of exposure of from 5 to 60 minutes, while the remaining two isolates Brevibacterium and Bacillus nanhaiensis frigoritolerans demonstrated lower survival in the presence of NaClO (0 - 16%). A parallel between the morphological type selected bacterial isolates, their ability to form a pellicle at the interface liquid / air and resistant to chlorine is drawn. This resistance to a sufficiently high concentration of sodium hypochlorite may develop as a result of natural selection through random mutation and / or due to the effect of the disinfectant, which can induce the occurrence of acquired resistance.*

*Keywords: bacterial biofilm, resistance, sodium hypochlorite, Bacillus nanhaiensis, Brevibacterium frigoritolerans, Lysinibacillus fusiformis.*

### **Список литературы**

1. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // Микробиология. – 2010. – Т. 79. – № 4. – С. 435 – 446.
2. Романова Ю. М., Смирнова Т. А., Андреев А. Л., Ильина Т. С., Диденко Л.В., Гинцбург А. Л. Образование биопленки – пример «социального поведения» бактерий // Микробиология. – 2006. Т. 75. – № 4. – С. 481 – 485.
3. Randall D., Wolcott M.D., Ehrlich Ph.D. Biofilms and Chronic infections // J. Amer. Med. Assoc. – 2008. – V. 299. – P. 2682 – 2684.
4. Alekshun M.N. The mar regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals / M.N. Alekshun, S.B. Levy // Trends Microbiol. — 1999. — Vol. 7. — P. 410–413.
5. Клінічна фармакологія: підручник / Кол. авторів; за ред. О.Я. Бабака, О.М. Біловола, І.С. Чекмана. – К.: Медицина. – 2008. – С. 556 – 595.
6. Roberts M.E. Modelling protection from antimicrobial agents in biofilms through the formation of persister cells / M.E. Roberts, P.S. Stewart // Microbiology. — 2005. — Vol. 15. — P. 75–80.
7. Lewis K. Persister Cells and the Riddle of Biofilm Survival / K. Lewis // Biochemistry. — 2005. — Vol. 70(I. 2). — P. 327–336.
8. McDonnell G., Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance / G. McDonnell, A.D. Russell // Clinical Microbiology Reviews. — 1999. — Vol. 12, №. 1. — P. 147–179.
9. Мокиенко А.В., Петренко Н.Ф., Гоженко А.И. Адаптивная мультирезистентность бактерий: вклад в эволюцию эпидемического процесса // Профілактична медицина. – 2011. – № 2 (14). – С. 90 – 95.
10. Holingre E., Ross K., Robertson C. et al. Molecular analysis of point-of-use municipal drinking water microbiology // Water Res. – 2014. – V. 49. – P. 225 – 235.
11. Wenfang L., Zhisheng Y., Hongxun Z., et al. Diversity and dynamics of microbial communities at each step of treatment plant for potable water generation // Water Res. – 2014. – V. 52. – P. 218 – 230.
12. Kwon S., Moon E. Pyrosequencing demonstrated complex microbial communities in a membrane filtration system for a drinking water treatment plant // Microb. Environ. – 2009. – V. 26 (10). – P. 149 – 155.
13. Pinto A., Xi C., Raskin N. Bacterial community structure in the drinking water microbiome is governed by filtration processes // Environ. Sci. Technol. – 2012. – V. 46 (16). – P. 8851 – 8859.
14. Kormas K. Changes of the bacterial assemblages throughout an urban drinking water distribution system // Environ. Monitor. Asses. – 2010. – V. 165 (1). – P. 27 – 38.

15. Revetta R., Pemberton A., Lamendella R. et al. Identification of bacterial populations in drinking water using 16S rRNA-based sequence analyses // *Water Res.* – 2010. – V. 44. – P. 1353 – 1360.
16. Henne K., Kahlisch L., Brettar I. et al. Analysis of Structure and Composition of Bacterial Core Communities in Mature Drinking Water Biofilms and Bulk Water of a Citywide Network in Germany // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – V. 78 (10). – P. 3530 – 3538.
17. ДСанПіН 2.2.4-400-10. "Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною" – Введ. 12.05.10.
18. Berber V.B., Gomes B.P. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms // *Int. Endod. J.* – 2006. – V. 39 (11). – P. 878 – 885.
19. Микробиологическая диагностика дисбактериозов: Метод. рекомендации. – К., 1986. – 27 с.
20. Булыгина Е.С., Кузнецов Б.Б., Марусина А.И., Кравченко И.К., Быкова С.А., Колганова Т.В., Гальченко В.Ф. // Изучение нуклеотидных последовательностей *pifH* генов у представителей метанотрофных бактерий. – *Микробиология.* – 2002. – 71. – 4. – С. 500-508.
21. Lane D. J. 16S/23S sequencing // In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / Stackebrandt E. a. Goodfellow M. (Eds.). - Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. - 1991. – P. 115-175.
22. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1977. – 84. – P. 5463-5467.
23. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. // BLAST+: architecture and applications. - *BMC Bioinformatics.* – 2009. - Dec 15. – 10. – P. 421.
24. Friedman L, Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms // *Molec. Microbiol.* – 2004. – V. 51 (3). – P. 675 – 690.
25. Fitnat H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation // *Microbiology* – 1999. – V. 96. – P. 4028 – 4033.
26. Y. Isolation and Characterization of Rugose Form of *Vibrio cholerae* O139 Strain MO10 // *Infect. Immun.* – 1999. – V. 67. – P. 958 – 963.
27. Morris J. *Vibrio cholerae* O1 Can Assume a Chlorine-Resistant Rugose Survival Form that Is Virulent for Humans // *J. Infect. Dis.* – 1996. – V. 174. – P. 1364 – 1368.
28. Карнаух Э.В., Летник Я.В. Резистентность микроорганизмов к современным противомикробным лекарственным средствам // *EUROPEAN STUDENT SCIENTIFIC JOURNAL.* – 2014. – № 2.
29. Страчунский Л.С, Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. (ред.) Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. – 2007.
30. Stackebrandt E., Ebers J. // Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. - *Microbiology today.* – 2006. – P. 152-155.
31. Рой И. Ю., Клименко Н. А., Здоровенко Г. М., Гончарук В.В. // *Хим. и Техн. Воды.* – 2014. – 36 (4). – С. 341 – 353.