

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. М.В. ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

**ПАНАСОВЕЦ ОЛЬГА ПЕТРОВНА**

**РАЗРАБОТКА ЖИДКОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НАКОПЛЕНИЯ  
ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ ИЗ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ**

03.00.07 - микробиология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2007

Работа выполнена в лаборатории санитарно-микробиологических, вирусологических методов исследования и экологической экспертизы ФГУН «Ростовского научно-исследовательского института микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора и на кафедре микробиологии МГУ им. М.В.Ломоносова.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, профессор

**Нетрусов Александр Иванович** (03.00.07 - микробиология)

**Консультант:**

кандидат медицинских наук

**Алешня Валентина Валентиновна** (14.00.07 - гигиена)

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук

**Ножевникова Алла Николаевна**

доктор биологических наук

**Ушакова Нина Александровна**

**Ведущая организация:** ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН, г. Москва

**Защита состоится « 13 » ноября 2007 года** в 15 ч 30 мин на заседании Диссертационного совета Д 501.001.21 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, г. Москва. Ленинские горы, д.1, корп. 12, биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, аудитория 3 А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. В.М. Ломоносова.

Автореферат разослан « 12 » октября 2007 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

**Н.Ф. Пискункова**

## ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Актуальность проблемы** Вопрос обеспечения рационального использования и охраны природных ресурсов страны постоянно находится в центре внимания правительства РФ. Важным шагом в этом направлении явилось принятие в 1999 г. закона «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (№ 52 – ФЗ от 30.03.1999). Настоящий Федеральный закон направлен на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения как одного из основных условий реализации конституционных прав граждан на охрану здоровья. В данном законе также предусмотрены санитарно-эпидемиологические требования к охране окружающей среды, несоблюдение которых может создать угрозу возникновения и распространение заболеваний, в том числе инфекционных.

Но, несмотря на все меры, направленные на борьбу с инфекционными болезнями, ежегодно регистрируются все новые вспышки инфекций, имеющие несомненный водный характер, вызываемые бактериями рода *Salmonella* (Онищенко, 2000; Parker et al., 2001; Гуменюк и др., 2002; Ковалев и др., 2002).

Данные микроорганизмы обладают выраженной биологической пластичностью, позволяющей им адаптироваться и существовать в различных экологических ситуациях. Ряд исследователей показали, что сальмонеллы могут длительное время переживать в водной среде. При этом они способны не только выживать, но и сохранять свои биохимические характеристики и патогенные свойства (Chipperfield, 1974; Карцев и др., 1975; Добрянская и др., 1979; Гума и др., 1988). Кроме того, они обладают способностью размножаться в водных объектах. Особенно это качество проявляется в воде загрязненной органическими соединениями (Гречаная, Ситков, 1975; Багдасарьян и др., 1980; Соловых и др., 1998; Di Pietro et al., 2000). В стрессовых условиях (понижение или повышение температуры относительно оптимума, воздействие химических веществ, нехватка питательных веществ и др.) сальмонеллы могут переходить в состояние некультивируемости, сохраняя при этом свои биологические свойства, в том числе и патогенный потенциал (Четина и др., 1992; Гинсбург, Романова, 1997; Литвин и др., 2004; Бухарин и др., 2005). Что снижает точность оценки уровня загрязнения сальмонеллами водных объектов. Снижение заболеваемости населения,

сальмонеллезами, связанными с водным фактором, является проблемой, решение которой во многом зависит от своевременных профилактических мер на основе оценки качества воды с помощью качественных сред и методов исследования. В течение нескольких десятилетий в практике здравоохранения РФ применяются магниевая и селенитовая среды накопления для выделения сальмонелл из водных объектов (Гипп, 1975; МУК 4.2.1884 – 04). Данные среды недостаточно эффективны. По данным исследователей с помощью данных сред выделяется лишь 40 – 60 % сальмонелл, находящихся в исследуемом объекте (Калина, 1978; Головина и др., 1997). Вещества–ингибиторы, входящие в состав выше указанных сред, подавляют рост не только сопутствующей микробиоты, но и некоторых сероваров сальмонелл. Так же, в действующих нормативных документах, рекомендуют применять сразу две среды накопления (магниевую и селенитовую) при оценке загрязнения сальмонеллами водной среды (МУК 4.2.1884 – 04). Поскольку эти среды имеют разную чувствительность, это приводит к несопоставимости результатов исследования, снижению эффективности метода, невозможности проведения достоверной оценки эпидемической опасности воды.

**Цель и задачи исследования** Целью нашего исследования явилось разработка и обоснование возможности использования новой среды накопления для повышения эффективности выделения сальмонелл, в том числе и некультивируемых форм, из водных объектов различной степени бактериального загрязнения. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. В экспериментальных условиях подобрать минеральный состав новой среды, факторы роста, ингибирующие вещества для конкурирующих видов микроорганизмов, рН.
2. В экспериментальных условиях проверить способность новой питательной среды к возможности размножения в ней сальмонелл и торможению роста возможной сопутствующей микробиоты. Сравнить новую среду с наиболее используемыми в настоящее время средами.
3. Показать возможность применения новой среды накопления для выделения некультивируемых форм сальмонелл из водных объектов.

4. Разработать методические приемы, позволяющие проводить исследования на наличие сальмонелл с высокой степенью достоверности результата.

5. В полевых условиях с использованием новой питательной среды и разработанными методическими приемами провести исследования проб воды взятых в биотопах с различной степенью биологического загрязнения в сравнении со средами общепринятыми в практике здравоохранения.

#### **Научная новизна работы**

- Разработана новая жидкая среда накопления для выделения сальмонелл из водных объектов, превосходящая по чувствительности и эффективности накопления аналоги, используемые в настоящее время в практике здравоохранения РФ. Защищена патентом № 2006115322/13 от 11. 04. 2007 г.

- Показана эффективность применения новой среды для реверсии некультивируемых форм сальмонелл, что позволяет повысить достоверность оценки загрязнения сальмонеллами водных объектов.

#### **Научно-практическая значимость**

Материалы диссертации использованы при подготовке аналитической справки «Об экологическом мониторинге за санитарно-показательными, потенциально патогенными и патогенными микроорганизмами в водных объектах Юга Российской Федерации» (письмо Федеральной службы Роспотребнадзора № 0100/2723.05-26 от 14.04.2005 г о возможности использования документа Федеральной службой в практической работе).

Материалы диссертации использованы при подготовке аналитической справки «О степени загрязнения водных объектов Юга России патогенными, потенциально-патогенными и санитарно-показательными микроорганизмами» (письмо Управления Федеральной службы Роспотребнадзора по Ростовской области № 07-64/12357 от 10.11.2006 г об использовании документа для формирования Федерального информационного фонда социально-гигиенического мониторинга).

Разработан проект нормативно-технической документации (Технические условия, Пусковой регламент производства, инструкция по применению, этикетка на флакон и др.) для промышленного производства «Питательной среды накопления для выделения сальмонелл из водных объектов». В настоящее время

разработанная нормативно-техническая документация находится на согласовании в ФГУН «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Роспотребнадзора.

Внедрение новой среды накопления для сальмонелл в практику здравоохранения позволит осуществлять более объективный мониторинг за санитарным состоянием водных объектов с целью своевременного проведения оперативных мероприятий против распространения сальмонеллезом водным путем.

### **Апробация работы**

Результаты и основные положения работы представлены на научно-практической конференции «Региональные проблемы окружающей среды, здоровья населения и санитарно-эпидемиологического благополучия» (Ростов-на-Дону, 2004), всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье» (Суздаль, 2005), на заседании Ученого совета ФГУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (Ростов-на-Дону, 2007), на межлабораторной конференции сотрудников лаборатории санитарно-микробиологических методов исследования и экологической экспертизы и лаборатории микробиологии и разработки иммуно-биологических препаратов ФГУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (Ростов-на-Дону, 2007).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из них 2 в центральной печати журналах из списка ВАК Минобразования РФ.

### **Объем и структура работы**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы описания материалов и методов исследования, изложения собственных экспериментальных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Объем рукописи составляет 120 страниц. Работа иллюстрирована 23 таблицами и 17 рисунками. Список литературы содержит 203 источника, в том числе 164 отечественных.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

В соответствии с поставленной целью работы объектами исследований в экспериментальных условиях служили следующие культуры бактерий:

1. *S. typhi* № 1196 – представитель возбудителей тифо-паратифозных заболеваний, для которого характерен водный путь передачи инфекционного начала.
2. *Salmonella paratyphi B* № 506, *Salmonella paratyphi B* № 8006 – как более устойчивые во внешней среде из группы паратифозных заболеваний.
3. *Salmonella typhimurium* № 301, *Salmonella typhimurium* № 9640, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella anatum*, *Salmonella derby* – широко циркулирующие среди людей и животных, и наиболее часто выделяемые из воды открытых водоемов в Южной зоне РФ.
4. *Staphylococcus aureus* № 6538 – рАТСС, *Escherichia coli* № 3912/41 (O55:K59), *Shigella flexneri* 2a № 170, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* – в качестве возможных микробных ассоциантов.

Штаммы получены из коллекции музея живых культур ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича Роспотребнадзора, все нереперентные штаммы выделены из воды р. Дон.

Все штаммы обладали типичными морфологическими, культуральными, биохимическими и серологическими свойствами.

**Оценку качества сравниваемых накопительных сред** проводили согласно «Методическим рекомендациям к контролю питательных сред по биологическим показателям» (1981) по следующим критериям: показатель эффективности, показатель ингибирования, скорость роста, показатель стабильности основных свойств микроорганизмов.

Исследования проводили с использованием разработанной нами среды, в качестве сред сравнения были взяты магниевая среда (МР «Применение магниевой среды для выделения сальмонелл из испражнений больных и носителей, пищевых продуктов, сточных жидкостей и воды открытых водоемов», 1973) и селенитовый бульон Лейфсона (ФС 42-3589-98).

С целью выяснения возможности перехода сальмонелл в некультивируемое состояние, а так же их реверсии были использованы следующие штаммы: *S. paratyphi B* № 8006, *S. typhimurium* № 9640, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. anatum*.

Для получения некультивируемых форм сальмонелл использованы следующие методы:

1. Сальмонеллы в количестве  $10^2$  и  $10^7$  КОЕ/мл выдерживали в дистиллированной воде в темноте при температуре:

а) + 6 °С;

б) + 37 °С (Романова, 1997).

С определенным интервалом отбирали пробы жидкости и определяли количество клеток с помощью:

- титрования на плотной питательной среде (МПА – мясопептонный агар);
- титрования на плотной питательной среде с добавлением каталазы;
- полимеразной цепной реакции;

2. Взвеси культур (в концентрации  $10^2$  и  $10^7$  КОЕ/мл) прогревали на водяной бане при температуре 56 °С в течение 1 – 14 мин. Для регистрации выживаемости популяций с периодичностью 1 мин отбирали пробы полученной взвеси и определяли количество живых клеток при помощи:

- титрования на плотной питательной среде (МПА);
- титрования на плотной питательной среде с добавлением каталазы (Шелухович и др., 2005);

Некультивируемыми считали сальмонеллы в пробе, из которой на твердой питательной среде не выросло ни одной клетки.

Полимеразную цепную реакцию проводили на многоканальном амплификаторе МС-2 «Герцик» (Россия) на базе отдела диспансеризации клинико-лабораторного мониторинга больных ВИЧ-инфекцией Южного Регионального Центра по борьбе со СПИДом.

**При проведении проверки реверсирующей способности** различных сред накопления для сальмонелл были использованы следующие тест-штаммы сальмонелл: *S. paratyphi B* № 8006, *S. typhimurium* № 9640, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. anatum*. В эксперимент взяты магниевая, селенитовая среды (как часто используемые в практике лабораторий) и разработанная нами среда. Суспензию, содержащую сальмонеллы в НС, полученные указанными выше способами, засеивали по 1 мл в 9 мл среды накопления. Культивировали при температуре 37 °С



в течение 24 ч, затем по 0,1 мл высевали на МПА для подсчета выросших колоний. Контролем служил прямой высев 0,1 мл взвеси на МПА.

**При определении возможности реверсии НФ** в организме теплокровных животных использовали следующие тест-штаммы: *S. paratyphi B* № 8006, *S. typhimurium* № 9640, *S. typhimurium*. При определении вирулентности сальмонелл, указанные выше культуры, перешедшие в НС под воздействием повышенной температуры (56 °С), вводили внутрибрюшинно белым мышам самцам весом 16-18 г в объеме 1 мл. Доза заражения составила  $10^7$  КОЕ/мл. Для заражения на каждый штамм брали по 10 мышей. Контролем служила группа животных (10 мышей), которым не вводили суспензию сальмонелл. Для бактериологического исследования брали кусочки паренхиматозных органов (печени и селезенки). Посев производили параллельно на чашки с висмут-сульфит-агаром и среды накопления (предлагаемую, магниевую и селенитовую) с последующим пересевом на чашки с висмут-сульфит-агаром. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Дальнейшее определение биохимических и серологических признаков проводили по действующим нормативным документам.

Содержание аминного азота определяли формольным титрованием согласно ФС 42 – 3874 – 99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских и иммунобиологических препаратов». Величину рН измеряли с помощью иономера универсального ЭВ-74 со стеклянным электродом.

При изучении эффективности разработанной среды **в полевых условиях** исследована вода р. Дон, вода горканизации г. Ростова-на-Дону и г. Азова.

В соответствии с участками водопользования и гидрологическим режимом на Нижнем Дону для исследования были выбраны следующие биотопы:

- № 1 – в районе водозабора № 2 г. Ростова-на-Дону;
- № 2 – в районе городского пляжа г. Ростова-на-Дону;
- № 3 – в районе Речного вокзала г. Ростова-на-Дону;
- № 4 – 500 м ниже впадения р. Темерник;
- № 5 – 500 м ниже выпуска сточных вод горканизации г. Ростова-на-Дону;
- № 6 – в районе водозабора г. Азова;
- № 7 – в районе городского пляжа г. Азова;

№ 8 – 500 м ниже выпуска горканализации г. Азова.

Отбор проб сточных вод горканализации городов Ростова-на-Дону и Азова осуществляли:

№ 1 – в приемной камере;

№ 2 – после первичных отстойников;

№ 3 – после вторичных отстойников;

№ 4 – после очистки.

Отбор проб производили батометром в стерильные бутылки из поверхностного горизонта на глубине 0,5 м. При этом регистрировалась метеорологическая обстановка: температура воздуха и воды, атмосферные осадки. Пробы отбирали во все сезоны года.

Объем работ в полевых условиях составил 165 проб воды.

**При исследовании воды поверхностных водоемов** производили посев 100,0 мл воды во флаконы, содержащие 100,0 мл среды, 10,0 мл – во флаконы с 10,0 мл среды, 1,0 мл и последующие разведения (от  $10^{-1}$  до  $10^{-3}$ ) в пробирки, содержащие 9 мл среды в 2-х параллельных рядах. Посевы инкубировали 24 ч при температуре 37 °С. Из каждой емкости, где отмечено равномерное помутнение среды делали петлей высева на 2 чашки с висмут-сульфит-агаром. Через 24 ч инкубации при температуре 37 °С отбирали подозрительные на сальмонеллы колонии. Окончательное определение биохимических и серологических свойств проводили по действующим нормативным документам.

**При исследовании сточных вод до очистки:** засеивали 2 объема по 1,0 мл и по 2 объема из разведений от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$ ; после очистки – 2 объема по 100 мл, 2 объема по 10,0 мл, 2 объема по 1,0 мл и по 2 объема из разведений  $10^{-1}$  до  $10^{-3}$ . Посевы инкубировали 24 ч при температуре 37 °С. Из каждой емкости, где отмечено равномерное помутнение среды делали петлей высева на 2 чашки с висмут-сульфит-агаром. Через 24 ч инкубации при температуре 37 °С отбирали подозрительные на сальмонеллы колонии. Окончательное определение биохимических и серологических свойств проводили по действующим нормативным документам.

Определение количества сальмонелл проводили по таблицам Хоскинса-Мура (МУК 4.2.1884-04).

Статистическую обработку полученных данных осуществляли по стандартной методике вычисления ( $M \pm m$ ) и критерия Стьюдента. Число вариантов  $\geq 3$ . Достоверность различий оценивали при уровне вероятности  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поскольку цель работы – создание среды накопления, важно было подобрать питательную основу, позволяющую накапливать биомассу сальмонелл, и вещества – ингибиторы роста возможной сопутствующей микробиоты. При решении вопроса о составе среды накопления для сальмонелл приняты во внимание не только собственные, но и данные других исследователей.

При определении влияния экстракта кормовых дрожжей, едкого натра и калия фосфорнокислого однозамещенного на накопление сальмонелл установлено, что оптимальным соотношением этих ингредиентов является содержание 4,5 – 5,0 г/л, 1,3 – 1,4 г/л, 8,6 – 8,8 г/л, соответственно. рН составил 6,6 – 6,8. Увеличение или уменьшение концентрации ингредиентов приводило к повышению или понижению рН, что снижало эффективность накопления тест-штаммов.

В качестве ингибиторов сопутствующей микробиоты нами были выбраны бриллиантовый зеленый и кристаллический фиолетовый. Анализ полученных данных свидетельствует, что 0,01 % раствор кристаллического фиолетового не задерживает рост сальмонелл в концентрациях 8,0 мл/л, 9,5 мл/л, 10,0 мл/л, 20,0 мл/л. Данные концентрации также не оказывают влияния на рост *E. coli* и *K. pneumoniae*. В тоже время рост *E. faecalis* полностью подавлялся при добавлении в среду 10,0 и 20,0 мл/л 0,01 % раствора кристаллического фиолетового. Добавление к питательной основе 0,1 % раствора бриллиантового зеленого в концентрации 4,0 мл/л не повлияло ни на рост сальмонелл, ни на рост сопутствующей микробиоты. Увеличение вносимой концентрации до 5,0 – 10,0 мл/л не оказывало подавляющего воздействия на рост сальмонелл, но ингибировало рост *E. coli*, *K. pneumoniae* и *E. faecalis*. Сочетание 5,0 мл/л 0,1 % раствора бриллиантового зеленого и 10,0 мл/л 0,01 % раствора кристаллического фиолетового привело к подавлению роста *E. coli*, *K. pneumoniae* и *E. faecalis* при посеве 1000, 100 и 10 КОЕ/мл, не оказывая влияния на рост тест-штаммов сальмонелл.

В результате проведенной работы сконструирована среда накопления для выделения сальмонелл из водных объектов, в которую в качестве источника питания мы ввели сухой экстракт кормовых дрожжей (5,0 г/л), соли калия (8,8 г/л) и натрия (1,4 г/л) для создания оптимальной рН, 0,1 % раствор бриллиантового зеленого (5,0 мл/л) и 0,01 % раствор кристаллического фиолетового (10 мл/л), в качестве ингибиторов роста сопутствующей микробиоты.

Сконструированная среда накопления прошла всестороннюю проверку – изучены ее физико-химические и биологические свойства. Среда накопления представляет собой прозрачную жидкость, травянисто-зеленого цвета, рН – 6,6 – 6,8, содержание аминного азота – от 0,8 до 1,0 %.

Предлагаемая среда накопления чувствительна: обеспечивает рост тест-штаммов сальмонелл при посеве единичных клеток, чем выгодно отличается от аналогичных сред, применяемых в практике здравоохранения в настоящее время (табл. 1).

Таблица 1.

Сравнение чувствительности сред накопления для сальмонелл

Тест-штамм	Опытная среда			Магниева среда			Селенитовая среда		
	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$
<i>S. typhi</i> № 1196	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. paratyphi</i> В № 506	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. paratyphi</i> В № 8006	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>S. typhimurium</i> № 301	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhimurium</i> № 9640	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>S. typhimurium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>S. derby</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>S. enteritidis</i>	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>S. anatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Примечание: + сплошной рост, - рост отсутствует

Наименьшее время, которое требуется для накопления биомассы сальмонелл составляет 6 ч, оптимальным же является 24 ч при инкубации при температуре 37 °С.

Культуры сальмонелл, выращенные на разработанной среде, обладали типичными свойствами.

При изучении эффективности накопления сальмонелл, получены следующие данные: накопление биомассы *S. paratyphi* В № 506, *S. typhimurium* № 301, *S. typhimurium* № 9640, *S. typhimurium*  $3 \times 10^7$  раз, *S. paratyphi* В № 8006 – в  $7 \times 10^8$  раза, *S. anatum* – в  $2 \times 10^8$  раз. Магниева среда уступает по эффективности накопления некоторым сероваров сальмонелл. Так, накопление *S. paratyphi* В № 506 в 1,5 раза меньше, чем на предлагаемой, *S. typhimurium* № 9640 – в 3,3 раза, *S. typhimurium* – 4,4 раза, *S. anatum* – в 5,0 раз (табл. 2).

Таблица 2

Сравнение эффективности накопления сальмонелл при использовании предлагаемой и магниевой сред накопления (посевная доза 10 КОЕ/мл)

Тест-штамм	Предлагаемая среда	Магниева среда	n	t	p
	Количество сальмонелл (КОЕ/л)				
	$M_1 \pm m_1$	$M_2 \pm m_2$			
<i>S. paratyphi</i> В № 506	$3 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$	$2 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7$	9	2,5	<0,02
<i>S. paratyphi</i> В № 8006	$6 \times 10^9 \pm 3 \times 10^8$	$1 \times 10^5 \pm 1 \times 10^4$	9	17,9	<0,001
<i>S. typhimurium</i> № 301	$3 \times 10^8 \pm 2 \times 10^7$	$1 \times 10^8 \pm 1 \times 10^7$	9	4,1	<0,001
<i>S. typhimurium</i> № 9640	$3 \times 10^8 \pm 4 \times 10^7$	$9 \times 10^6 \pm 4 \times 10^5$	9	4,3	<0,001
<i>S. typhimurium</i>	$1 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7$	$3 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$	9	2,5	<0,02
<i>S. anatum</i>	$2 \times 10^9 \pm 4 \times 10^8$	$4 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7$	9	3,6	<0,001
<i>S. derby</i>	$7 \times 10^7 \pm 8 \times 10^6$	$1 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$	9	8,0	<0,001

Увеличение биомассы на селенитовой среде было незначительным (табл. 3).

Сравнение эффективности накопления сальмонелл  
при использовании предлагаемой и селенитовой сред накопления  
(посевная доза 10 КОЕ/мл)

Тест-штамм	Предлагаемая среда	Селенитовая среда	n	t	p
	Количество сальмонелл (КОЕ/л)				
	$M_1 \pm m_1$	$M_2 \pm m_2$			
<i>S. paratyphi</i> В № 506	$3 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$	$3 \times 10^2 \pm 2 \times 10$	9	5,1	<0,001
<i>S. typhimurium</i> № 301	$3 \times 10^8 \pm 2 \times 10^6$	$1 \times 10^2 \pm 5,7$	9	10,2	<0,001
<i>S. typhimurium</i> № 9640	$3 \times 10^8 \pm 4 \times 10^7$	рост отсутствует	-	-	-
<i>S. typhimurium</i>	$1 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$	рост отсутствует	-	-	-
<i>S. anatum</i>	$2 \times 10^9 \pm 4 \times 10^8$	рост отсутствует	-	-	-
<i>S. derby</i>	$7 \times 10^7 \pm 8 \times 10^6$	рост отсутствует	-	-	-
<i>S. paratyphi</i> В № 8006	$6 \times 10^9 \pm 3 \times 10^8$	рост отсутствует	-	-	-

Разработанная нами среда накопления позволяет ингибировать рост всех тест-штаммов (*E. coli* № 3912/41, *S. aureus* № 6538- рАТСС, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *Sh. flexneri* 2 а № 170) при посеве 100, 100 и 10 КОЕ/мл. В тех же условиях селенитовая среда не подавляла роста *S. aureus* № 6538- рАТСС, *E. faecalis*, а магниевая среда не обеспечивала подавления роста *E. coli* № 3912/41, *E. coli* и *K. pneumoniae*. При изучении ингибирующих свойств сравниваемых сред с применением смеси тест-штаммов (*E. coli* № 3912/41 из разведения  $10^{-5}$  и *S. paratyphi* В № 506 из разведения  $10^{-6}$ ) было зарегистрировано подавление роста кишечных палочек на предлагаемой среде при культивировании суспензии при

температуре 37 °С в течение 24 ч, тогда как селенитовая и магниевая не задерживали роста данного микроорганизма (табл. 4).

Таблица 4.

Показатель ингибирования роста сопутствующей микрофлоры  
с применением смеси тест-штаммов

Среда	<i>S. paratyphi</i> В № 506 (КОЕ/мл)	<i>E. coli</i> № 3912/41 (КОЕ/мл)
Предлагаемая	$3 \times 10^{10} \pm 5 \times 10^7$	Рост отсутствует
Магниевая	$1 \times 10^{10} \pm 2 \times 10^7$	$3 \times 10^3 \pm 4 \times 10^2$
Селенитовая	$3 \times 10^4 \pm 1 \times 10^3$	$1 \times 10^3 \pm 1 \times 10^2$

Установлено, что хранение разработанной среды при температуре от 2 до 25 °С в течение года не оказывало влияния на чувствительность, эффективность и ингибирующие свойства предлагаемой среды.

Нами установлена возможность перехода бактерий рода *Salmonella* в НС под действием повышенной температуры (56 °С), и сочетания действия пониженной температуры (6 °С) и отсутствия питательных веществ. Показано влияние на переход клеток в НС дозы заражения. Если в условиях повышенной температуры и дозы заражения  $10^2$  КОЕ/мл клетки сальмонелл переходили в НФ через 3 – 4 мин прогрева (рис. 1), то при увеличении вносимой дозы до  $10^7$  КОЕ/мл время перехода составило 14 мин (рис. 2).

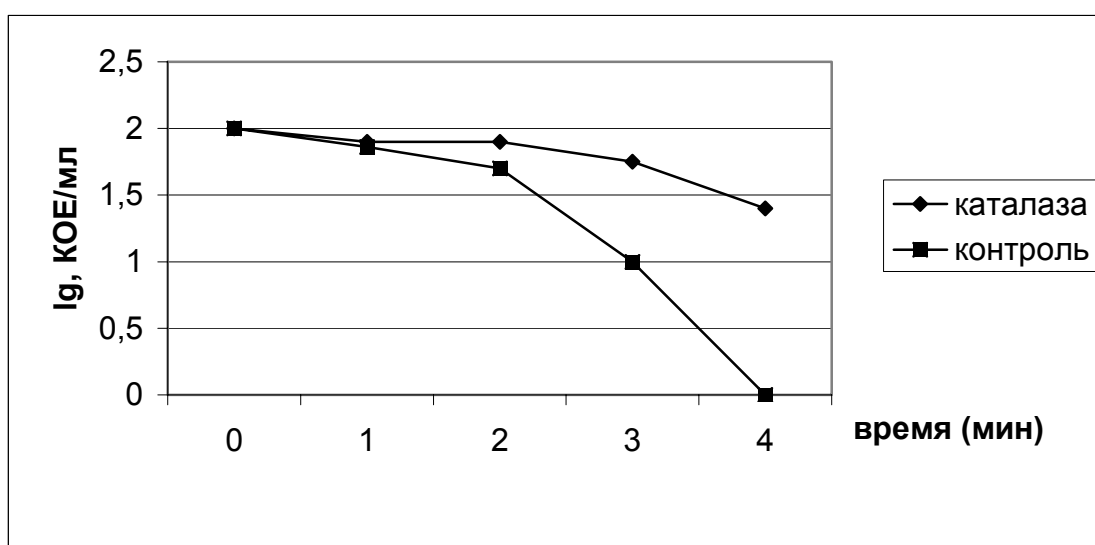


Рис. 1. Динамика образования НФ *S. typhimurium* № 9640, под действием повышенной температуры (доза заражения  $10^2$  КОЕ/мл).

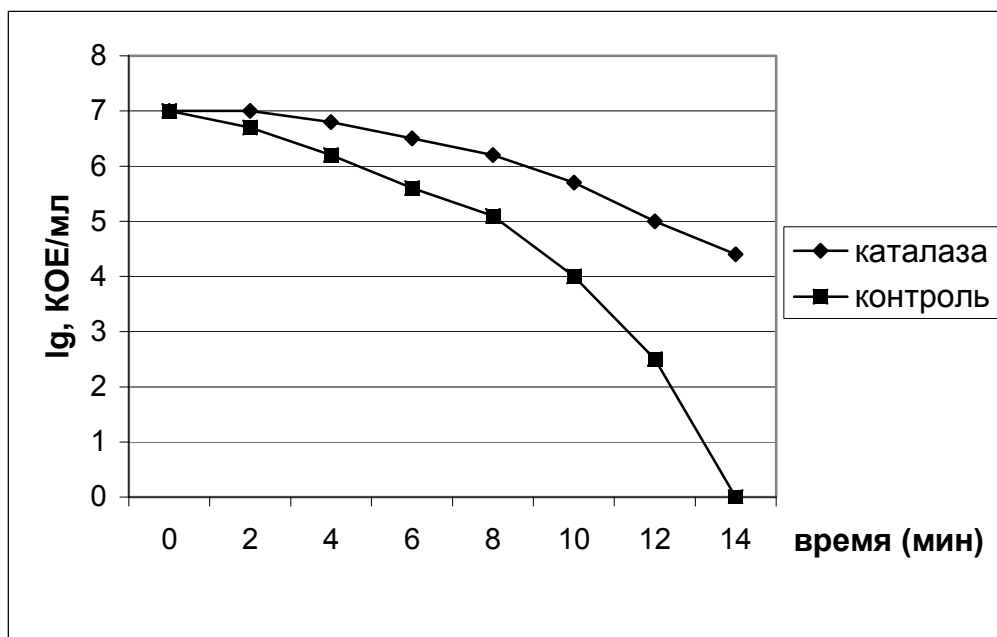


Рис. 2. Динамика образования НФ *S. typhimurium* № 9640, под действием повышенной температуры (доза заражения  $10^7$  КОЕ/мл ).

При культивировании сальмонелл при пониженной температуре и состоянии «голода» тест-штаммы переходили в НФ в течение 33 – 35 суток (доза заражения  $10^2$  КОЕ/мл) (рис. 3), то при увеличении дозы до  $10^7$  КОЕ/мл происходило и увеличение срока пребывания изучаемых культур в вегетативном состоянии на 95, 105 и 108 сутки у *S. paratyphi B* № 8006, *S. anatum*, *S. typhimurium* № 9640, соответственно. Добавление каталазы к суспензии клеток, содержащей НФ, приводило к реверсии клеток в вегетативное состояние, после того как указанные выше клетки переставали высеваться на твердых питательных средах.



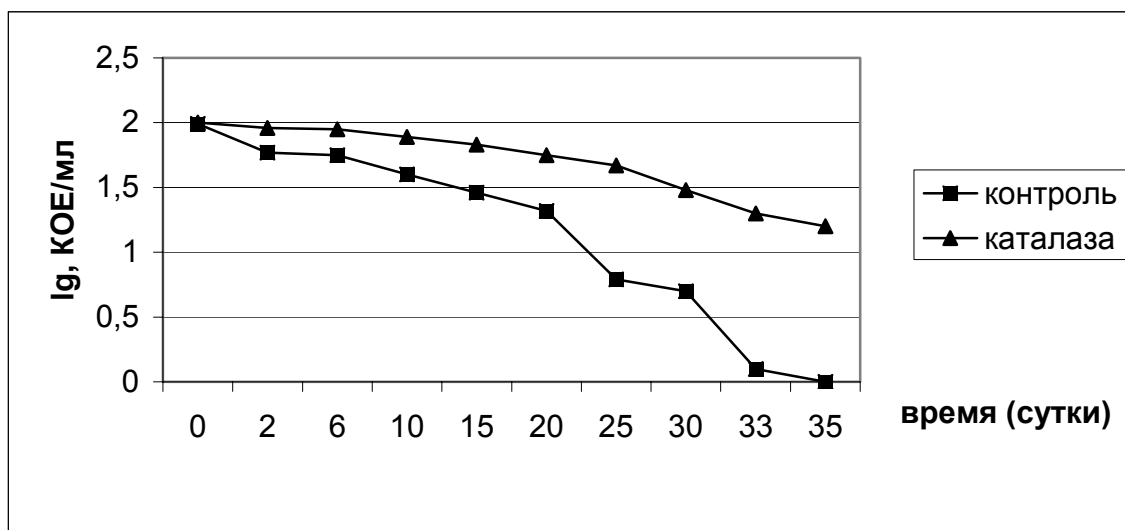


Рис. 3. Динамика образования НФ *S. typhimurium* № 9640, под действием пониженной температуры (доза заражения  $10^2$  КОЕ/мл ).

При изучении возможности реверсии клеток, находящихся в состоянии некультивируемости, с помощью сред накопления были получены следующие результаты: разработанная нами среда позволяла не только восстанавливать данные клетки, но и накапливать биомассу. Магниева и селенитовая среды таким действием не обладают.

Нами проведена серия экспериментов по изучению возможности сохранения НФ сальмонелл своих вирулентных свойств. Тест-штаммы (*S. paratyphi B* № 8006, *S. typhimurium* № 9640, *S. typhimurium*), прогретые при температуре  $56^\circ\text{C}$  в течение 14 мин в количестве  $10^7$  КОЕ/мл, вводили белым мышам-самцам внутрибрюшинно по 1 мл. Через 24 ч данные тест-штаммы выделены из печени и селезенки животных, что свидетельствует о сохранении НФ сальмонелл своих биологических свойств. В контрольной группе не отмечено выделение вышеуказанных штаммов,

Эффективность предлагаемой среды накопления для сальмонелл была доказана при проведении полевых испытаний. С помощью различных сред накопления было исследовано 56 проб сточной воды городов Ростова-на-Дону и Азова. При изучении воды горканализации г. Ростова-на-Дону сальмонеллы выделены в 100,0 % исследованных проб с помощью разработанной нами среды, в 84,4 % – с магниевой и лишь в 18,8 % – с селенитовой. Средний индекс сальмонелл составил  $6015,6 \pm 3310,0$  КОЕ/л при использовании предлагаемой среды,  $202,2 \pm 63,9$  КОЕ/л – магниевой и  $3,4 \pm 1,2$  КОЕ/л – селенитовой. При исследовании воды

горканализации г. Азова в 83,3 % проб были обнаружены сальмонеллы при использовании разработанной среды, 66,6% и 33,3 % – магниевой и селениновой сред, соответственно. Средний индекс составил  $1380,6 \pm 459,5$  КОЕ/л при использовании разработанной нами среды,  $65,3 \pm 22,0$  КОЕ/л – магниевой и лишь  $6,0 \pm 2,1$  КОЕ/л – селениновой. Всего на разных этапах очистки сточной воды выделено 437 культур бактерий рода *Salmonella* 47 сероваров. Из них 280 культур при помощи разработанной среды, 127 – магниевой и лишь 30 – селениновой. При использовании разработанной среды из воды горканализации чаще других выделены следующие серовары: *S. derby*, *S. essen*, *S. typhimurium*, *S. brandenburg*, *S. enteritidis*, магниевой – *S. brandenburg*, *S. derby*, *S. essen*, *S. heidelberg* и *S. derby*, *S. brandenburg*, *S. reading* – селениновой. При этом с использованием опытной среды было выделено 196 культуры сальмонелл группы В, 99 – с применением магниевой и 25 – селениновой среды, тогда как группы С – 44, 15 и 4, группы D – 22, 9 и 1, группы E – 18, 4 и 0, соответственно.

Было исследовано 109 проб р. Дон, взятых в биотопах с различной степенью бактериального загрязнения. В целом по водоему бактерии рода *Salmonella* выделены в 93,6 % проб с применением разработанной среды, с магниевой – в 70,6 % проб и всего лишь в 25,7 % – с селениновой (рис. 4). Среднее количество искомым микроорганизмов в 1 л составило  $501,8 \pm 78,8$  КОЕ/л при применении сконструированной среды, тогда как с применением магниевой и селениновой –  $21,1 \pm 6,2$  и  $9,4 \pm 2,0$  КОЕ/л, соответственно (рис. 5). С использованием разработанной нами среды в целом по водоему было выделено 57 сероваров сальмонелл, 34 – с магниевой и 15 – с селениновой. При этом всего выделено 520 культур, из них 342 при использовании разработанной среды, 141 – с магниевой и лишь 37 – с селениновой. Из воды р. Дон чаще других выделены следующие серовары: *S. derby*, *S. typhimurium*, *S. essen*, *S. kimuenza*, *S. brandenburg* с применением разработанной нами среды, *S. derby*, *S. heidelberg*, *S. brandenburg* – с магниевой и селениновой сред.

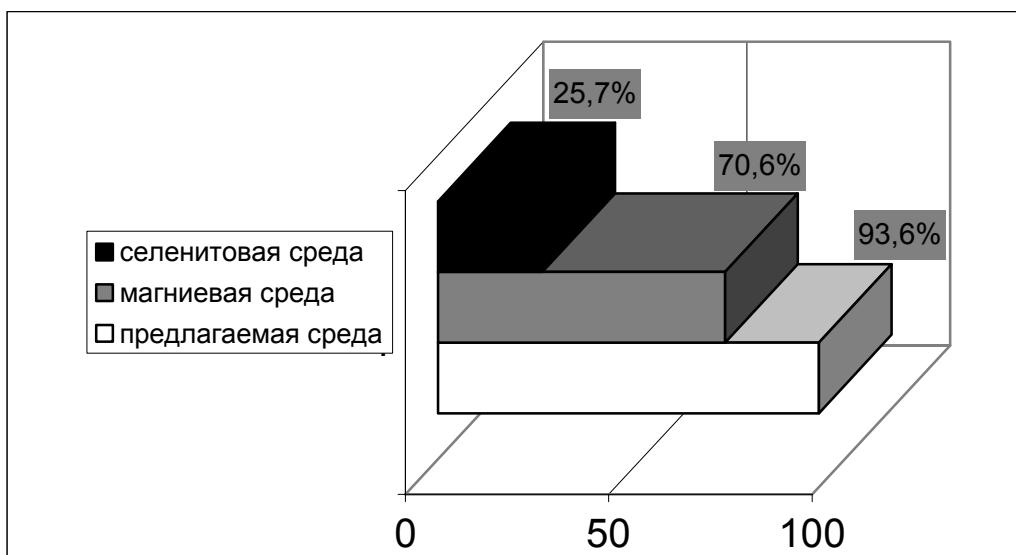


Рис. 4. Частота выделения сальмонелл из воды р. Дон с использованием разных сред накопления.

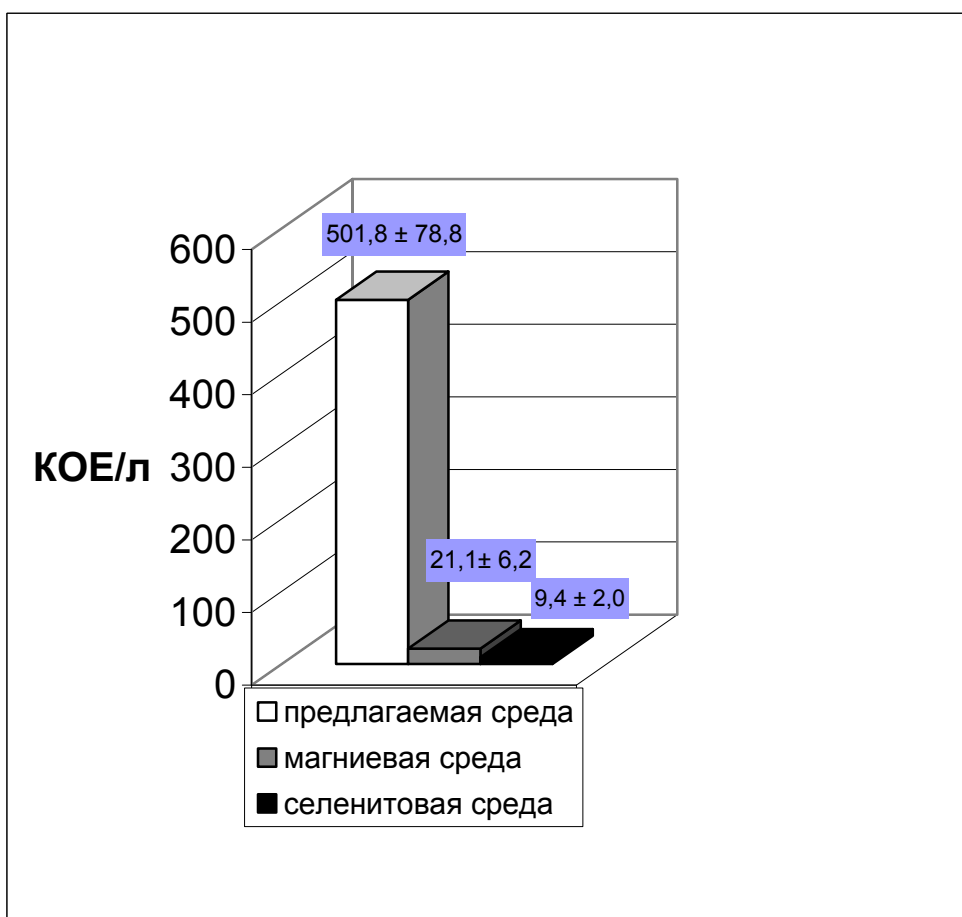


Рис. 5. Количество сальмонелл в 1 л исследуемой воды при использовании различных сред накопления.

Все выше сказанное позволяет рекомендовать разработанную нами среду накопления для сальмонелл к использованию при проведении санитарно-микробиологического мониторинга воды различной степени бактериального загрязнения. Среда обладает всеми характеристиками, предусмотренными в нормативных документах: она чувствительна, эффективна, позволяет задерживать рост сопутствующей микробиоты, проста в применении и изготовлении.

## ВЫВОДЫ

1. На основании изучения питательных потребностей сальмонелл был подобран оптимальный состав и соотношение ингредиентов, обеспечивающие высокий темп накопления микробной популяции: питательная основа – экстракт кормовых дрожжей и минеральные соли. Введение в состав среды 0,1 % раствора бриллиантового зеленого и 0,01 % раствора кристаллического фиолетового позволило добиться подавления роста возможной сопутствующей микробиоты. Среда состоит из непищевого сырья и отечественных реактивов, не нуждается в корректировке pH, добавления дополнительных веществ.
2. Сконструирована среда накопления для сальмонелл по чувствительности, эффективности накопления и показателю ингибирования превосходит среды аналогичного назначения.
3. В полевых условиях доказана более высокая эффективность предлагаемой среды, при изучении воды различной степени бактериального загрязнения.
4. В экспериментальных условиях доказана возможность существования сальмонелл в некультивируемом состоянии в водной среде, а также показано сохранение вирулентных свойств сальмонелл, находящихся в некультивируемом состоянии, при заражении белых мышей.
5. Показана возможность рекультивации сальмонелл, находящихся в некультивируемом состоянии, при помощи разработанной среды накопления для выделения сальмонелл из водных объектов.
6. Разработана технология производства среды накопления для сальмонелл (Технические условия, Пусковой регламент производства, инструкция по

применению, этикетка на флакон и др.) Разработанная среда накопления защищена патентом № 2006115322/13 от 11. 04. 07 г.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Головина С.В., Журавлев П.В., Алешня В.В., Панасовец О.П.  
Бактериологический мониторинг за качеством воды поверхностных водоемов // материалы пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и МЗ Российской Федерации «Социально-гигиенический мониторинг: методология, региональные особенности, управленческие решения» 17- 19 декабря 2003. М., 2003, 77 – 79.
2. Алешня В.В., Головина С.В., Журавлев П.В., Панасовец О.П. и др.  
Методические подходы к выделению условно-патогенных микроорганизмов из водных объектов // материалы Всероссийской научно-практической конференции «Медицинская микробиологии – XXI век», 28 – 30 сентября 2004. Саратов, 2004, 19 – 20.
3. Алешня В.В., Головина С.В., Журавлев П.В., Панасовец О.П.  
Распространение и количественная характеристика сальмонелл в нижнем течении реки Дон // материалы пленума Научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и Минздрава и соцразвития Российской Федерации «Современные проблемы медицины окружающей среды», 16 – 17 декабря 2004, М., 2004, 10 – 11.
4. Панасовец О.П. Разработка жидкой среды накопления для выделения сальмонелл из водных объектов // сборник научных трудов «Региональные проблемы окружающей среды, здоровья населения и санитарно-эпидемиологического благополучия». Ростов-на-Дону, 2004, 138 – 139.
5. Панасовец О.П. Экспериментальные и натурные испытания новой среды обогащения для сальмонелл из водных объектов // материалы Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье», 19 – 22 мая 2005. Суздаль, 2005, 382 – 383.

6. Алешня В.В., Головина С.В., Журавлев П.В., Панасовец О.П. и др. Значение индикаторных микроорганизмов в оценке микробного риска при питьевом водопользовании // материалы пленума научного совета по экологии человека и гигиене окружающей среды РАМН и Минздрава и соотвразвития Российской Федерации «Экологически обусловленные ущербы здоровью: методология, значение и перспективы оценки», 22 – 23 декабря 2005. М., 2005, 178 – 180.
7. Недачин А.Е., Артемова Т.З, Дмитриева Р.А. и др. Проблемы эпидемической безопасности питьевого водопользования населения России // Гигиена и санитария, 2005, 6, 14 – 18.
8. Журавлев П.В., Головина С.В., Алешня В.В., Панасовец О.П. и др. Усовершенствованная питательная среда для выделения сальмонелл из водных объектов // материалы IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, 26 – 27 апреля 2007. М., 2007, т. 3, 28 – 29.
9. Панасовец О.П., Нетрусов А.И, Головина С.В. и др. Обоснование возможности применения новой жидкой среды накопления для выделения сальмонелл из водных объектов // ЖМЭИ, 2007, 4, 54 – 56.