САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**Вахрушев Роман Андреевич**

**ПРОБЛЕМЫ ВЫЯВЛЕНИЯ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ИЗ ОБРАЗЦОВ ВОДЫ В ЗАМКНУТЫХ СИСТЕМАХ ОЧИСТКИ С РЕЖИМОМ НЕПРЕРЫВНОЙ САНАЦИИ**

Выпускная квалификационная работа бакалавра

по направлению подготовки Биология

основная образовательная программа бакалавриата 020400 Биология

|  |
| --- |
| Работа выполнена на кафедре микробиологии СПбГУ  Научный руководитель – старший преподаватель каф. микробиологии СПбГУ, к.б.н. Е.Ю.Дмитриева |

Санкт-Петербург

2018 г.

**Содержание.**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | | | Стр. |
| **1.** | **Введение.** | | | 4 |
| **2.** | **Обзор научной литературы** «Проблемы гигиенического контроля воды в замкнутых непрерывно санируемых системах с применением санитарно-показательных бактерий». | | | 6 |
|  | 2.1. | Водные объекты аквакультуры и профессиональной аквариумистики – новые объекты, требующие гигиенического контроля. | | 6 |
|  | 2.2. | Способы микробиологического контроля предприятий аквакультуры и профессиональной аквариумистики с замкнутой системой оборота воды и непрерывной санацией. | | 10 |
|  | 2.3. | Методы выявления санитарно-показательных бактерий в образцах воды из объектов с замкнутой системой водоснабжения и их недостатки. | | 14 |
|  | 2.4. | Способы восстановления жизнеспособности и метаболической активности поврежденных бактерий. Воздействие санирующих агентов (озона и ультрафиолета) на жизнеспособность и метаболическую активность бактериальных клеток. | | 16 |
| **3.** | **Объекты и методы исследования.** | | | 21 |
|  | 3.1. | Характеристика объекта исследования. | | 21 |
|  | 3.2. | Определение общего микробного числа воды. | | 22 |
|  | 3.3. | Титрационный метод оценки численности колиформных бактерий по МУК 4.2.1884-04. | | 22 |
|  | 3.4. | Восстановление жизнеспособности колиформных бактерий с обратимыми сублетальными повреждениями. | | 24 |
|  | 3.5. | Оценка численности поврежденных клеток колиформных бактерий в санируемой аквариумной воде. | | 24 |
|  | 3.6. | Оценка влияния слизеобразующих бактерий санируемой аквариумной воды на эффективность выявления колиформных бактерий. | | 25 |
|  | 3.7. | Повышение эффективности выявления колиформ по стандартной методике МУК 4.2.1884-04. | | 25 |
|  |  | 3.7.1. | Оценка влияния варианта засева (степени разбавления) на эффективность выявления колиформ в аквариумной воде. | 25 |
|  |  | 3.7.2. | Достоверность подтверждения принадлежности изолятов колиформ к виду *E.coli* в соответствии с МУК 4.2.1884-04. | 26 |
| **4.** | **Результаты и их обсуждение.** | | | 27 |
|  | 4.1. | Микробиологические показатели исследованной аквариумной воды в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.5.980-00. | | 27 |
|  | 4.2. | Численность колиформных бактерий с сублетальными повреждениями в санируемой аквариумной воде и восстановление их жизнеспособности. | | 28 |
|  | 4.3. | Влияние процедуры восстановления жизнеспособности на численность колиформных бактерий, выявляемых по МУК 4.2.1884-04. | | 30 |
|  | 4.4. | Влияния слизеобразующих бактерий санируемой аквариумной воды на выявление колиформных бактерий после восстановления их жизнеспособности. | | 32 |
|  | 4.5. | Оптимизация этапов выявления колиформ и *E.coli* по МУК 4.2.1884-04 с учетом особенностей микробиоты санируемой аквариумной воде. | | 35 |
|  |  | 4.5.1. | Влияние способа засева в накопительную среду на  эффективность выявления колиформ и *E.coli.* | 35 |
|  |  | 4.5.2. | Достоверность подтверждения принадлежности изолятов  колиформ к *E.coli* в соответствии с МУК 4.2.1884-04. | 37 |
|  | 4.6. | Обсуждение и заключение. | | 39 |
| **5.** | **Выводы.** | | | 40 |
| **6.** | **Список научной литературы.** | | | 41 |

1. **Введение.**

В современном мире все большее внимание уделяется микробиологической безопасности объектов аквакультуры и аквариумистики. Такие системы имеют замкнутый режим циркуляции воды, которая подвергается непрерывной фильтрации и санации озоном и УФ-облучением. В этих условиях происходит формирование специфической микробиоты в составе биопленок на поверхности фильтров, стен, грунта.

Объекты с замкнутой системой циркуляции воды и присутствующими гидробионтами характеризуются повышенным содержанием общих колиформных бактерий. Одновременно в таких популяциях вместе с колиформами могут присутствовать возбудители кишечных заболеваний человека, которые могут длительно персистировать на гидробионтах, заносится с кормом, инструментом, руками обслуживающего персонала.

По этой причине вода подобных объектов находится под контролем Федеральной государственной службы - Роспотребнадзора. Тем не менее, до сих пор не разработан специальный нормативно-методический документ для оценки безопасности воды океанариумов. Оценку гигиенического состояния воды океанариумов проводят по содержанию колиформных бактерий в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.5.980-00 для воды рекреационного водопользования и в черте населенных мест (не более 500 КОЕ общих колиформных бактерий и не более 100 КОЕ термотолерантных колиформ в 100 мл воды). Данный документ не учитывает специфические особенности микробиоценоза в непрерывно санируемой аквариумной воде при замкнутом режиме пользования. Требования СанПиН 2.1.5.980-00 практически не выполнимы для воды океанариумов при постоянном высоким уровнем фекального заражения.

В настоящий момент оценку гигиенического состояния воды СтПетербургского Океанариума проводят по нормативу Вирджинского аквариума в США (Virginia Aquarium, 2016) - по показателю *E.coli* – не более 235 клеток в 100 мл воды. Корректность применения этого показателя и норматива к СтПетербургскому Океанариуму доказана пока не была.

На кафедре микробиологии уже на протяжении нескольких лет ведется работа по изучению особенностей микробиоты аквариумной воды в замкнутом цикле в условиях непрерывной санации воды. Было показано, что присутствие *E.coli* в санируемой аквариумной воде СтПетербургского Океанариума очень низкое, на пределе выявления (Цесулис, 2008; Аламмар, 2017). Основными представителями колиформных бактерий являются не *E.coli,* а *Klebsiella* и *Citrobacter*. Безусловно, непрерывный режим санации (озонирование, ультрафиолетовое излучение, лечебные препараты для гидробионтов, вносимые в воду), влияют на качественный и количественный состав колиформных бактерий и на эффективность их выявления. Низкое содержание или даже отсутствие *E.coli* в составе колиформ в аквариумной воде можно было бы объяснить их более высокой чувствительностью к дезинфекции воды и наличию у бактерий сублетальных и летальных повреждений, что может привести к их потере на стадии накопления по стандартной методике (МУК 4.2.1884-04). Действительно, по литературным данным степень повреждения бактерий при подобных воздействиях может затрагивать 99% популяции (Ray, 1989). Такие повреждения могут быть восстановлены в среде, содержащей легкоусвояемые субстраты, за 1-2 часа инкубации. Поэтому для получения корректных оценок численности бактерий необходимо проводить этап восстановления. Подобные попытки в отношении санируемой аквариумной воды до сих пор не проводились.

Можно констатировать, что для разработки специального нормативно-методического документа по оценке гигиенического состояния непрерывно санируемой аквариумной воды следует провести специальные исследования по изучению особенностей микробиоты, степени ее повреждения в условиях санации, подобрать режим восстановления жизнеспособности колиформных бактерий и подтвердить адекватность этапов выявления колиформ и *E.coli* по стандартной методике МУК 4.2.1884-04.

В связи с выше изложенным, целью данной работы было повышение эффективности выявления колиформных бактерий и *E.coli* в непрерывно санируемой аквариумной воде СтПетербургского Океанариума. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Определить численность колиформных бактерий, имеющих обратимые сублетальные повреждения.
2. Разработать и оценить эффективность методики восстановления обратимых сублетальных повреждений колиформных бактерий.
3. Оптимизировать метод выявления колиформ и *E.coli*, описанный в МУК 4.2.1884-04 применительно к непрерывно санируемой аквариумной воде.

**2.** **Обзор научной литературы «Проблемы гигиенического контроля воды в замкнутых непрерывно санируемых системах с применением санитарно-показательных бактерий».**

**2.1. Водные объекты аквакультуры и профессиональной аквариумистики – новые объекты, требующие гигиенического контроля.**

Сегодня все большую роль в мире приобретают предприятия аквакультуры и аквариумистики. Аквариумистика – это искусственное разведение рыбы с целью наблюдения, изучения и демонстрации рыб посетителям. К объектам аквариумистики относят любительские и профессиональные аквариумы, а также океанариумы (Ford, 1981). Особенностью профессиональных аквариумов и океанариумов является замкнутый тип оборота воды (Toonen et al., 2005).

Аквакультура – это искусственное разведение рыбы с целью ее дальнейшего употребления в пищу. К объектам аквакультуры относят предприятия по выращиванию продуктовой рыбы (ФАO, 2016).

Объекты аквакультуры могут быть открытыми. В этом случае рыба выращивается во внутренних водоемах, либо в прибрежной зоне (ФАO, 2016). Однако сегодня в аквакультуре прослеживается тенденция на создание экологически чистых систем с замкнутым режимом циркуляции воды и возможностью контроля за условиями выращивания гидробионтов (Bregnballe, 2015).

Объекты аквариумистики, а также предприятия аквакультуры, сконструированные с системой замкнутого водоснабжения, объединяет то, что они имеют сходные системы очистки и санации воды. Объекты аквакультуры характеризуются наличием механических и биологических фильтров, а также систем санации воды с применением озона и ультрафиолета. Механические фильтры очищают воду от твердых частиц размером более 40-100 микрон. На биологических фильтрах продукт метаболизма рыб – аммоний - превращается в нитрит, а затем в нитрат благодаря активности нитрифицирующих бактерий (Bregnballe, 2015). Вода на объектах аквариумистики также проходит очистку при помощи механических и биологических фильтров и подвергается санации озоном и ультрафиолетом (Аламмар, 2017).

Несмотря на проводимую очистку и санацию, объекты аквакультуры и объекты аквариумистики с рециркуляцией воды могут оказаться опасными для здоровья людей из-за возможного присутствия в воде возбудителей желудочно-кишечных заболеваний. Имеются сведения о том, что с объектами аквакультуры и аквариумистики уже были связаны вспышки инфекционных кишечных заболеваний. Так, по данным Ламма в США за 1970 и 1971 год было зарегистрировано 3 x 105 случаев сальмонеллеза, связанных с разведением черепах в домашних аквариумах (Lamm et al., 1972). Большое количество вспышек заболевания привело к необходимости введения запрета в 1975 году на продажу яиц, а также живых черепах, которые не были проверены на присутствие сальмонелл (Mitchell et al., 1990). Несмотря на введенные ограничения, вспышки заболеваний продолжают происходить, поскольку многие покупают черепах нелегально, либо в онлайн-магазинах, на которых запрет не действует (Basler et al., 2015). Так, одна из вспышек произошла в 2014 году в США, когда 40 человек было инфицировано сальмонеллами серотипа *Salmonella Poona*. Инфекционный штамм был выделен из домашних черепах (Basler et al., 2015). Две вспышки заболеваний детей произошли в 2009 году в Испании и также были связаны с черепахами. Из аквариумной воды были выделены сальмонеллы серотипов *Salmonella paratyphi B var. Java* и *Salmonella litchfield* (Lafuente et al., 2013).

В связи с выше изложенным, становится актуальным вопрос о том, как патогены человека попадают в воду объектов аквариумистики и аквакультуры. Основным источником патогенов в воде являются инфицированные гидробионты. В литературе описано множество случаев, когда гидробионты являлись переносчиками возбудителей желудочно-кишечных заболеваний человека. Так, в работе Саркара была проанализирована микробиота рыб, выращиваемых в пресноводной аквакультуре. Из 105 исследованных рыб 28 было инфицировано *Vibrio paraheamoliticus*. Бактерии были выделены из слизи на поверхности рыб, из жабр и кишечника рыб (Sarkar et al., 1985).

В исследовании, проведенном в Израиле (Senderovich et al., 2010), было показано, что рыбы являются переносчиками *Vibrio cholereae*. Из 14 видов пресноводных рыб у 10 было обнаружено присутствие возбудителя холеры в кишечнике. 32% всех изолятов были потенциально опасны для человека, поскольку имели гены, кодирующие секреторную систему 3 типа, а также ген, кодирующий токсин гемолизин. Авторами работы сделано предположение, что именно рыбы являются промежуточным звеном в цепи передачи возбудителя холеры от веслоногих ракообразных к водоплавающим птицам.

Еще один представитель р. Vibrio – *Vibrio vulnificus* был выделен из жабр и кишечника нильской тилапии, выращиваемой в пресноводной прибрежной аквакультуре в Бангладеше. В исследовании также отмечается устойчивость 28 из 33 выделенных изолятов к антибиотику цефалотину, и 2 – к гентамицину (Mahmud et al., 2010).

По данным Вестоффа (Westhoff et al., 1993) в кишечнике полосатого окуня, разводимого на предприятиях аквакультуры, находились такие патогены человека как *Shigella dysenteriae* и *Plesiomonas shigelloides*, а на поверхности чешуи рыб - *Staphylococcus aureus*. В работе Ван Дамма (Van Damme et al., 1980) было подтверждено присутствие в кишечнике 11 различных видов пресноводных рыб возбудителя *Plesiomonas shigelloides*. Наряду с этим, в этой работе было обнаружено присутствие в кишечнике рыб патогенного штамма *Edwardsiella tarda*.

Как было отмечено выше переносчиками сальмонелл могут стать домашние черепахи (Basler et al., 2015). Сальмонеллами также могут быть инфицированы рыбы и креветки (Rahimi et al., 2013).

Таким образом, гидробионты являются переносчиками широкого круга патогенов человека. Как правило, инфицирование гидробионтов происходит в разведенческих центрах, а заражение воды объектов аквариумистики и аквакультуры – на этапе интродукции гидробионтов в систему. В настоящий момент считается доказанным, что микробиота кишечника рыб формируется под влиянием микробиоты кормов и воды (Кузьмина, 2016). Заселение кишечника происходит уже на стадии личинки. Поэтому по составу микробиоты кишечника рыб можно судить о том, в каком состоянии находятся разведенческие центры (Кузьмина, 2016).

Конкретная роль центров разведения рыбы в передаче патогенов была показана в работе Траста (Trust et al., 1974). Авторы исследовали микробиоту воды, которая поставлялась вместе с продаваемыми аквариумными рыбками в зоомагазинах и универмагах. Были установлены высокие значения общего микробного числа – от 7 x 103 до 7 x 106 клеток бактерий/100 мл воды и термотолерантных колиформ – от 4 x 102 до 2 x 103 клеток термотолерантных колиформ/100 мл воды. Отмечено присутствие в воде *Pseudomonas aeruginosa*, *Edwardsiella tarda*, *Klebsiella pneumoniae*, а также представителей *р. Vibrio*.

После этапа интродукции рыб возбудители инфекционных кишечных заболеваний могут быстро распространиться в системе. Этому способствует плотная посадка рыбы на предприятиях аквакультуры, которая вызывает у них стресс. Длительное нахождение в стрессовых условиях в свою очередь вызывает понижение активности иммунной системы рыб, что и способствует распространению патогенов (Tort, 2011). Так, в работе Ваззаны (Vazzana et al., 2002) в условиях плотной посадки у рыб было отмечено повышение уровня кортизола, обладающего иммуносупрессорными свойствами. Кроме того, цитотоксическая активность эозинофилов и образование активных форм кислорода внутри макрофагов были снижены. Показано, что стресс у рыб может также снижать активность системы каскада комплемента (Sunyer et al., 1995) и уменьшать уровень продукции антител после иммунизации (Verburg‐Van Kemenade et al., 2009). Результатом этого становится легкая передача патогенов человека от рыбы к рыбе и появление их в воде объектов аквакультуры и аквариумистики.

Помимо гидробионтов большую роль в появлении возбудителей инфекционных кишечных заболеваний в объектах аквариумистики и аквакультуры играет человеческий фактор. Инфицирование воды может происходить при контакте с водой посетителей (в случае открытых аквариумов), чистке аквариумов аквалангистами, при погружении рук персонала или инструментов в воду во время обслуживания аквариумов (Прокофьев, 2017).

Еще одним источником инфицирования служат искусственные корма для рыб. Так, в работе Траста были исследованы 25 различных искусственных кормов для рыб. Только 1 из них оказался стерильным, остальные содержали от 9 x 102 до 1,3 x 106 аэробных мезофильных бактерий в 1 г корма. Кроме того, было показано, что на питательных средах, приготовленных из кормов, способны расти такие патогены как *Clostridium tetani*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei* (Trust et al., 1972). В исследовании, проведенном в Японии, в 3 из 20 проанализированных искусственных кормов для рыб были обнаружены представители *р. Vibrio*, и в 10 - *Clostridium perfringens* (Kitao et al., 1976). При исследовании микробиоты кормов в Индии были выделены изоляты *Vibrio parahaemolyticus* и *Vibrio cholerae* (Raghavan, 2003).

После проникновения патогенов в воду в условиях замкнутых систем аквакультуры и аквариумистики формируется постоянный внутренний источник инфицирования воды – в форме биопленок, которые содержат патогенов (Виждан, 2017). Такие биопленки могут формироваться на поверхности гидробионтов, водных растений, декора аквариума, грунта и в биофильтрах. Находясь в биопленках, патогены избегают воздействия санирующих агентов и могут сохранять жизнеспособность в течение 1-3 месяцев (Sidhu et al., 2009).

Микробиологический состав биопленок на предприятиях аквакультуры с замкнутой системой циркуляции воды был исследован Кингом (King et al. 2004). В его работе на 9 предприятиях аквакультуры (на 2 из которых выращивалась камбала, а на остальных - тиляпии) были отобраны образцы биопленок с поверхности 9 различных материалов (включая стекловолокно, пластмассу, ПВХ, стекло, нержавеющую сталь, резину, алюминий, пеноматериал и цемент). В образцах было обнаружено присутствие таких патогенов человека как *Bacillus cereus*, *Vibrio cholereae*, *Shigella sp.*

В работе Мичауда (Michaud et al., 2009) были исследованы образцы биопленок, взятые из биофильтров на предприятии морской аквакультуры по выращиванию лаврака с замкнутой системой рециркуляции воды. В составе биопленок были выявлены патогенные представители *р. Vibrio* и *р. Coxiella.*

Наличие инфицированных биопленок – непостоянная закономерность, но высоко вероятная. При различных механических воздействиях (например, при чистке биофильтров) небольшие куски биопленок с патогенами могут выходить в воду и, таким образом, опосредовано приводить к ее инфицированию.

В связи опасностью для здоровья людей объекты аквакультуры и аквариумистики должны подлежать гигиеническому контролю. Однако источники опасности – гидробионты, биопленки не могут быть подвергнуты мониторингу безопасности. Поэтому оценка гигиенического состояния должна осуществляться по воде. В качестве показателя микробиологической безопасности можно оценивать присутствие санитарно-показательных микроорганизмов сверх определенной нормы.

Санитарно-показательные микроорганизмы – это микроорганизмы, постоянно обитающие в полостях тела животных и человека. Вместе с выделениями организма они поступают в окружающую среду, где могут сохранять жизнеспособность в течение определенного времени. Принято считать, что обнаружение этих микроорганизмов в окружающей среде указывает на ее загрязнение выделениями человека и животных. У больных людей или бациллоносителей вместе с этими же выделениями в окружающую среду могут поступать возбудители инфекционных кишечных заболеваний. Поэтому обнаружение санитарно-показательных микроорганизмов также косвенно указывает на возможное присутствие в исследуемом объекте и патогенного микроорганизма. Количественный подсчет санитарно-показательных микроорганизмов позволяет оценить степень загрязненности объекта выделениями человека или животных. Санитарно-показательные микроорганизмы служат не только индикатором фекального загрязнения, но и позволяют оценить эффективность процедур санации воды. (Калина, 1969).

Конкретное применение санитарно-показательных микроорганизмов как индикатора фекального загрязнения при контроле воды объектов аквакультуры и аквариумистики будет изложено в следующей главе.

**2.2. Способы микробиологического контроля предприятий аквакультуры и профессиональной аквариумистики с замкнутой системой оборота воды и непрерывной санацией.**

В РФ микробиологическая безопасность воды всех водных объектов (вода открытых водоемов, вода центральной системы водоснабжения, питьевая вода, вода плавательных бассейнов, аквапарков, океанариумов, предприятий аквакультуры) контролируется Федеральной Службой - Роспотребнадзором. Оценка микробиологической безопасности воды океанариумов и предприятий аквакультуры осуществляется по нормативам СанПиН 2.1.5.980-00 и методикам МУК 4.2.1884-04, которые предназначены для надзора за состоянием воды открытых водоемов рекреационного типа. В соответствии с вышеперечисленными документами основными показателями микробиологической безопасности воды являются “Общие колиформные бактерии” и “термотолерантные колиформные бактерии”, содержание которых в воде не должно превышать предельно допустимых значений.

Колиформные бактерии – это группа санитарно-показательных микроорганизмов, границы которой определяются биохимическими свойствами бактерий (в частности способностью сбраживать лактозу с образованием кислоты и газа при 37оС). К колиформным бактериям относят представителей родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* и *Serratia* (Zhang et al., 2015), а также *Pantoea* и *Kluyvera* (Аламмар, 2017). В системе гигиенического контроля эту группу называют общими колиформными бактериями (WHO, 2003). Общие колиформы – индикатор эффективности санации воды. Повышение содержания общих колиформ может указывать на недостаточную или неэффективную санацию (Tallon et al., 2005). Значение показателя “общие колиформы” в настоящее время снижается, поскольку некоторые из представителей этой группы способны жить сапрофитно в окружающей среде. Так, в работе Медрека (Medrek et al., 1960) 73.4% исследованных образцов почвы, не подвергавшихся фекальному загрязнению, содержали колиформных бактерий, способных образовывать кислоту и газ в лактозном бульоне. Присутствие представителей *р. Klebsiella* было обнаружено в озерах и прудах в Канаде (Campbell et al., 1976).

Загрязнение воды выделениями человека традиционно подтверждается показателем “термотолерантные колиформы”. Существуют представления о том, что термотолерантные колиформы присутствуют непосредственно в выделениях человека, а их обнаружение в воде указывает на ее вероятное загрязнение сточными водами (Geldreich et al., 1962; Калина, 1969). Границы группы “термотолерантные колиформы” определяются способностью сбраживать лактозу с образованием кислоты и газа при 44oС (WHO., 2003). 94% термотолерантных колиформ приходится на *Escherichia coli*, в состав этой группы также входят отдельные представители родов *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Citrobacter* (Tallon et al., 2005).

В качестве дополнительного индикатора фекального заражения воды рядом стран был введен показатель “*E.coli*”. Согласно публикации ВОЗ за 2003 год (WHO., 2003) этот показатель более точно указывает на степень загрязнения воды выделениями человека, поскольку представители термотолерантных колиформ (иные, чем *E.coli*) могут встречаться в стоках с промышленных предприятий, обогащенных органикой, на почвах с разлагающимися растительными остатками, а в тропиках – и в открытых водоемах. Однако на данный момент показано, что *E.coli* может существовать в воде, на поверхности водорослей, в почве тропических, субтропических регионов а при наличии большого количества субстратов для роста - и в умеренных регионах (Ishii et al., 2008).

Предельно допустимые значения содержания колиформных бактерий для водных объектов РФ представлены в табл. 1. В случае объектов аквариумистики в режиме рутинного контроля используются требования, предъявляемые к водоемам рекреационного типа с предельными содержаниями 500 КОЕ/100 мл воды для общих колиформных бактерий и 100 КОЕ/ 100 мл для термотолерантных колиформ.

**Таблица 1.**

**Гигиенические требования РФ к воде поверхностных водоемов, бассейнов и аквапарков**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Водные объекты | Предельное содержание | | Источник |
| Общие колиформы | Термртолерантные колиформы |
| Водоемы хозяйственно-бытового водоснабжения и водоснабжения пищевых предприятий | 1000 КОЕ в 100 мл | 100 КОЕ/100 мл | СанПиН 2.1.5.980-00 |
| Водоемы рекреационного водопользования, а также водоемы в черте населенных мест | 500 КОЕ в 100 мл | 100 КОЕ/100 мл | СанПиН 2.1.5.980-00 |
| Вода бассейнов и аквапарков | в 100 мл отсутствие | в 100 мл отсутствие | СанПиН 2.1.2.1331-03 |

Объекты аквакультуры и аквариумистики имеют специфические особенности – замкнутый режим циркуляции воды, постоянную санацию озоном и ультрафиолетом, в условиях которой происходит селекция микроорганизмов на устойчивость и их выживание в экстремальных условиях в составе биопленок. Поэтому оценка воды объектов аквакультуры и аквариумистики не может быть выполнена объективно по требованиям, предъявляемым к водоемам рекреационного типа. Изначальное содержание колиформных бактерий в системах с рециркуляцией воды выше, чем в поверхностных водоемах, даже несмотря на проводимую санацию. Так, в работе Парка в течение 4 месяцев в воде профессионального аквариума с рециркуляцией определялось содержание общих колиформ. Полученные значения варьировались от 4 х 103 до 2.2 х 104 клеток в 100 мл воды (Park, 1978). Согласно данным Кхо (Kho et al., 1992), среднее значение термотолерантных колиформ в воде исследованного предприятия аквакультуры с рециркуляцией составило 590 клеток / 100 мл. Такие высокие уровни колиформ по сравнению с поверхностными водоемами обуславливаются постоянным внесением микроорганизмов за счет персонала и посетителей, внесения в воду кормов, а также плотной посадкой гидробионтов в воде. Например, в экскрементах лососевых рыб уровень колиформ может достигать 104 КОЕ/г (Pullela et al., 1998). В исследовании Траста 8 из 25 образцов для рыб содержали теромтолерантных колиформ со средней численностью 324 клетки/ 10 г корма (Trust et al., 1972). Кроме того, очистка воды объектов аквакультуры и аквариумистики проводится регулярно за счет работы персонала, а не за счет самоочищения, как это происходит в открытых водоемах. В результате содержание общих и термотолерантных колиформных бактерий находится на пределе их допустимого содержания по СанПиН 2.1.5.980-00 (500 КОЕ/ 100мл), при этом общее микробное число (ОМЧ) остается низким (730 КОЕ/ 100мл) (Аламмар, 2017).

Оценка гигиенического состояния воды по СанПиН 2.1.5.980-00 предполагает отслеживание резких всплесков численности бактерий-индикаторов фекального заражения, которые на объектах аквакультуры и аквариумистики могут быть связаны с поступлением в воду инфицированных испражнений гидробионтов, кормов или освобождением биопленок с декора аквариумов и биофильтров. Однако на фоне исходной высокой численности колиформных бактерий, близкой к пороговым значениям для поверхностных водоемов, достоверная регистрация увеличения численности индикаторных бактерий затруднена.

Особенностью объектов аквакультуры и аквариумистики также является наличие сублетальных повреждений у санитарно-показательных микроорганизмов, присутствующих в воде. Так, по литературным данным степень повреждения колиформных бактерий может достигать 99%, причем эти повреждения могут быть обратимыми (Ray, 1989). Поэтому анализ гигиенического состояния по микробиологическим показателям не может быть выполнен корректно без восстановления жизнеспособности микроорганизмов до проведения анализа.

Помимо непрерывного государственного надзора на предприятиях аквакультуры и аквариумистики проводится внутренний контроль микробиологической безопасности воды. Так, в Виржинском океанариуме для гигиенического контроля воды используется показатель *E.coli* с предельно допустимым значением 235 клеток *E.coli* в 100 мл воды. Данный норматив используется и в СтПетербургском Океанариуме. Однако вышеприведенный норматив составлен не с учетом специфики объекта, а основывается на нормативе, используемом для контроля безопасности воды плавательных бассейнов (Virginia Aquarium Water Quality Parameters Explained, 2016).

**2.3. Методы выявления санитарно-показательных бактерий в образцах воды из объектов с замкнутой системой водоснабжения и их недостатки.**

При анализе воды объектов аквакультуры и аквариумистики используется титрационный метод выявления колиформ по МУК 4.2.1884-04 вместо рутинного фильтрационного из-за наличия взвеси в воде, которая мешает получению отдельных колоний на мембранных фильтрах. Оценка количества колиформных бактерий в титрационном методе является статистической и выражается в виде наиболее вероятного числа КОЕ в 100 мл исходной воды.

В связи со значительным преобладанием посторонних бактерий на первом этапе титрационного метода колиформ выявляют путем накопления в лактозо-пептонном бульоне при повышенной температуре 37оС в течение короткого периода времени – 24 часов. Засев накопительных сред проводят десятикратными разведениями исходного материала в тройной повторности.

Выделение колиформных бактерий из пробирок с признаками роста проводят путем высева на селективную питательную среду Эндо. На среде Эндо колиформы образуют темно-малиновые колонии, наличие которых оценивается при инкубации засеянных чашек при 37оС в течение 16-18 часов. На следующем этапе подтверждается способность изолятов образовывать кислоту и газ в лактозо-пептонном бульоне за 24 часа при 37оС (общие колиформы) и 44оС (термотолерантные колиформы).

На основании результатов составляют распределение присутствия и отсутствия колиформных бактерий в накопительных культурах и определяют численность бактерий статистическим методом наиболее вероятных чисел по таблице Мак Креди.

Согласно МУК 4.2.1884-04, в случае превышения предельно допустимых значений по показателям “общие колиформы” и “термотолерантные колиформы” проводится оценка воды по дополнительному показателю *E.coli* с целью расшифровки характера и происхождения микробного загрязнения. Предельно допустимое значение для данного показателя составляет 100 КОЕ в 100 мл воды.

Численность *E.coli* оценивается по способности термотолерантных колиформ образовывать индол из триптофана за 24 часа роста при 44оС или по способности образовывать кислоту и газ в лактозо-пептонном бульоне с борной кислотой за 24 часа при 44оС.

Вода объектов аквакультуры и аквариумистики подвергается непрерывной санации озоном и ультафиолетом. В связи с этим эффективность титрационного метода выявления колиформ в условиях жестких временных рамок может быть снижена на каждом из этапов его проведения из-за получения клетками бактерий повреждений ДНК, мембраны, клеточной стенки, которые снижают их метаболическую активность (Ray, 1989).

Имеются сведения о том, что растущая культура с поврежденными бактериями имеет длинную лаг фазу, во время которой протекают процессы авторепарации. По литературным данным время лаг фазы поврежденной *E.coli* может составлять от 5 (Sinskey et al., 1970) до 12,5 часов (Fukao et al., 1998). В условиях короткого 24 часового этапа накопления поврежденные колиформные бактерии не успевают восстановить жизнеспособность и накопиться в достаточном количестве, что может привести к снижению числа пробирок с признаками роста (пожелтением). Особенно сомнительным является возможность *E.coli* быстро (за 24 часа) образовывать индол из триптофана, поскольку согласно Руководству по систематике бактерий Берги образование индола из триптофана рекомендуется оценивать на 2 сутки (Brenner et al., 2005).

В литературе также имеются сведения о том, что различные селективные компоненты, входящие в состав питательных сред для выделения колиформных бактерий могут подавить рост поврежденных клеток. Это было показано для таких селективных факторов, как желчные соли, (Scheusner et al., 1971; Ray et al., 1972; Maxcy, 1973) и лаурилсульфат натрия (Scheusner et al., 1971; Ray et al., 1973). Воздействие селективных компонентов среды Эндо (фуксина, сульфита натрия) также затормаживает рост колоний в связи с утратой к ним устойчивости (Калина, 1969).

Можно предположить, что эффективность титрационного метода выявления колиформ можно повысить проведением этапа восстановления поврежденных бактерий. Однако восстановление жизнеспособности бактерий в непрерывно санируемой воде (озоном и ультрафиолетом) с замкнутой системой циркуляции воды до сих пор не изучалось. Тем не менее, имеется обширная информация о восстановлении жизнеспособности колиформных бактерий в пищевых продуктах (Ray, 1989). Основные данные по этому вопросу будут изложены в следующей главе.

**2.4. Способы восстановления жизнеспособности и метаболической активности поврежденных бактерий. Воздействие санирующих агентов (озона и ультрафиолета) на жизнеспособность и метаболическую активность бактериальных клеток.**

Вода объектов аквакультуры и аквариумистики подвергается непрерывной санации озоном и ультрафиолетом.

Ультрафиолетовое излучение – это электромагнитное излучение с длиной волны от 200 до 400 нм. Бактерицидной активностью обладает коротковолновый диапазон этого излучения – от 200 до 290 нм, с максимальной эффективностью при длине волны 254 нм – максимуме поглощения ультрафиолета молекулами ДНК. Механизм действия ультрафиолета заключается в образовании тиминовых димеров в цепи ДНК, что в последствии приводит к нарушению процесса репликации при делении клетки. Полученные повреждения могут быть восстановлены клеткой в результате работы ДНК-фотолиазы, активируемой при поглощении видимого света, либо в результате процессов темновой репарации (Ермилова Е. В., 2012).

Эффективность действия ультрафиолетового излучения при обработке воды аквакультуры была доказана рядом авторов. Согласно Лилтведу УФ излучение мощностью 2,7 мВт/см2 способно инактивировать 99,9% патогенов рыб в воде (Liltved et al, 1995). УФ-облучение также способно инактивировать патогенные вирусы рыб (Liltved et al., 2006).

Однако, если санируемая вода содержит большое количество взвешенных частиц, то бактерии могут избегать излучения в том случае, если они находятся на поверхности или внутри таких частиц. Рядом авторов была продемонстрирована прямая корреляция между содержанием колиформ и количеством твердых частиц в воде (Scheible et al., 1985; Whitby et al., 1993).

Озонирование – это еще один метод дезинфекции, используемый в аквакультуре и аквариумистике и основанный на применении озона, который обладает сильными окислительными свойствами. Озон способен окислять липиды и белки плазматических мембран, а также белки клеточной стенки. Это приводит к нарушению целостности структур клеточной оболочки, и зачастую к лизису клетки. Попадая в цитоплазму, озон способен инактивировать клеточные ферменты и вызывать повреждения ДНК (Mahfoudh et al., 2010).

Концентрация растворенного озона, летальная для рыб, низка и составляет 0,01 мг/л. Поэтому санацию с помощью озона совмещают с санацией УФ, который катализирует реакцию перехода молекулы озона в молекулу кислорода и таким образом способствует уменьшению концентрации озона в воде (Summerfelt, 2003). Комбинация озона дозой 0,1 мг/л и последующей обработки УФ дозой 50 мДж/см2 позволяют снизить численность гетеротрофных бактерий в воде предприятий аквакультуры практически до нуля (Sharrer et al., 2007).

Воздействие озона и ультрафиолета на клетки патогенов и колиформных бактерий, находящихся в воде, может приводить не только к их гибели, но и к возникновению обратимых сублетальных повреждений. Так, в эксперименте Капусчински (Kapuscinski et al., 1981) культура клеток *E.coli* была подвержена действию солнечного света. После 1,5 часов освещения число клеток на минимальной и полной питательных средах различалось в 2340 раз, а процент поврежденных клеток составил 99,9%, в то время как количество клеток на обоих средах, оставшихся в темноте, было одинаковым.

Санация озоном и ультрафиолетом может также привести к появлению жизнеспособных, но некультивируемых форм колиформных бактерий (Zhang et al., 2015). Жизнеспособные, но некультивируемые бактерии проявляют пониженную метаболическую активность и, как правило, не образуют колоний на питательной среде (Oliver, 2000). Показано, что в этом состоянии происходит уменьшение размеров клетки (Fakruddin et al., 2013), изменение белкового и липидного состава клеточной оболочки (Muela et al. 2008), уменьшение активности внутриклеточного транспорта, дыхания и синтеза макромолекул (Porter et al., 1995).

Повреждения, получаемые колиформными бактериями, а также способы их восстановления изучались в большом количестве работ, поскольку процедура восстановления жизнеспособности бактерий повышает чувствительность методов выявления колиформ и позволяет выявить проблемы, связанные с гигиеническим состоянием объектов намного раньше, уже на этапе мониторинга (Ray, 1989). Важно отметить, что исследования, посвященные установлению степени повреждений и способам восстановления жизнеспособности колиформных бактерий в замкнутых системах аквакультуры и аквариумистики с непрерывной санацией озоном и ультрафиолетом, не проводились, а весь материал посвящен в основном восстановлению поврежденных колиформ в пищевых продуктах.

Основные способы восстановления поврежденных бактериальных клеток основаны на активации их собственных репарационных механизмов. Для инициирования авторепарации клеткам создают благоприятные условия: их помещают в жидкие неселективные питательные среды, содержащие легкодоступные субстраты (например, триптон или пептон) и инкубируют при умеренной температуре в течение 1-2 часов.

Один из способов восстановления жизнеспособности основывается на использовании питательных сред, содержащих триптон или пептон – продукты ферментативного гидролиза белков животного происхождения. Необходимость триптона для восстановления повреждений колиформ была показана в опытах Мосса и Куо (Moss et al., 1966a; Kuo et al., 1969), в которых поврежденные клетки не образовывали колоний на минимальной среде, но добавление триптона позволяло восстановить повреждения и наблюдать признаки бактериального роста. Согласно Моссу активными компонентами триптона, которые способствуют репарации повреждений *E.coli*, являются короткие пептиды, преимущественно содержащие пролин, валин и глутаминовую кислоту (Moss et al., 1966a).

Страка с соавторами выдвинули гипотезу о том, что пептиды, содержащиеся в триптоне необходимы клеткам для ресинтеза ферментов и других белков, которые были денатурированы в результате воздействия повреждающих агентов (Straka et al., 1959). Согласно Арпаю (Arpai, 1964) наличие в среде пептидов может прервать деструктивные процессы в поврежденных клетках и стимулировать репарацию.

Эффективность процедур восстановления с использованием питательной среды, содержащей триптон или пептон, была исследована рядом авторов. Этап восстановления в среде с триптоном позволил выявить в 1,2 - 3,2 раза больше общих колиформ (Speck et al., 1973; Speck et al., 1975; Silk et al., 1997; McDonald et al., 1983) и в 1,7 раз – *E.coli* (Mossel et al., 1980) по сравнению с контролем без этапа восстановления. Среды на основе пептона выявили в 1,1 - 1,9 раз больше термотолерантных колиформ (Rose et al., 1975; Grabow et al., 1981).

Каталаза - еще один компонент, применявшийся исследователями для восстановления повреждений у колиформ. У поврежденных клеток этот фермент может быть инактивирован, поэтому каталаза, добавленная в питательную среду, компенсирует недостаток этого фермента в клетках, и не позволяет накапливаться пероксиду водорода в высоких концентрациях (Kapuscinski et al., 1981).

Среды восстановления на основе каталазы позволили ряду авторов выявить в 1,1 - 1,8 раз больше общих колиформ (Calabrese et al., 1990; Mossel et al., 1980) и в 2 раза больше термотолерантных колиформ (Calabrese et al., 1990) по сравнению с контролем без этапа восстановления.

Помимо вышеперечисленных компонентов для восстановления повреждений колиформ исследователями также применялись питательные среды с добавлением пирувата. Согласно литературным данным механизм действия пирувата заключается в деградации пероксида водорода, накапливающегося в поврежденных клетках (McDonald et al., 1983). При реакции пирувата с перекисью происходит неферментативное окислительное декарбоксилирование, в результате которого образуются уксусная кислота, углекислый газ и вода, которые могут быть утилизированы клеткой (Мецлер Д., 1980).

Среды для восстановления на основе пирувата позволили ряду авторов выявить в 1,6 – 3,6 раза больше общих колиформ (McDonald et al., 1983; Calabrese et al., 1990), в 2,7 раза больше термотолерантных (Calabrese et al., 1990) и 3 раза больше *E.coli* (Sartory, 1995) по сравнению с контролем без этапа восстановления.

Основные данные по способам восстановления жизнеспосбности колиформных бактерий приведены в табл. 2.

Таким образом, приведенные выше литературные данные свидетельствуют о том, что для эффективного и корректного гигиенического контроля воды океанариумов и предприятий аквакультуры необходимо:

1. Оценить количество клеток колиформных бактерий, имеющих обратимые сублетальные повреждения.
2. Разработать и опробировать методику восстановления обратимых сублетальных повреждений.
3. В свете полученных результатов оптимизировать метод выявления колиформ и *E.coli*, описанный в МУК 4.2.1884-04.

**Таблица 2.**

**Способы восстановления жизнеспособности колиформных бактерий и их эффективность**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Среда для восстано-вления | Повреж-дающий фактор | Объект восстановле-ния | Темпе-ратура инкуба-ции | Время инкуба-ции | Эффектив-ность восстанов-ления1 | Литератур-ный источник |
| Среды на основе триптона | Замораживание | Общие колиформы | 25°C | 1 час | 1,2 раза | Speck et al., 1973 |
| Замораживание | Общие колиформы | 35°C | 2 часа | 3,2 раза | Speck et al., 1975 |
| Низкая pH | Общие колиформы | 25°C | 2 часа | 1,6 раз | Silk et al., 1997 |
| Замораживание, нагревание | Общие колиформы | 25°C | 2 часа | 1,7 раз | McDonald et al., 1983 |
| Замораживание | *E.coli* | 25°C | 2 часа | 1,7 раз | Mossel et al., 1980 |
| Среды на основе пептона | Хлорирование | Термотоле-рантные колиформы | 35°C | 2 часа | 1,9 раз | Rose et al., 1975 |
| Хлорирование | Термотоле-рантные колиформы | 35°C | 2 часа | 1,1 раз | Grabow et al., 1981 |
| Пируват | Замораживание, нагревание | Общие колиформы | 25°C | 2 часа | 3,6 раз | McDonald et al., 1983 |
| Хлорирование | Термотоле-рантные колиформы | 44,5°C | 24 часа2 | 2,7 раз | Calabrese et al., 1990 |
| Хлорирование | Общие колиформы | 35°C | 24 часа2 | 1,6 раз | Calabrese et al., 1990 |
| Хлорирование | *E.coli* | 37°C | 18 часов2 | 3 раза | Sartory, 1995 |
| Каталаза | Хлорирование | Термотоле-рантные колиформы | 44,5°C | 24 часа2 | 2 раза | Calabrese et al., 1990 |
| Хлорирование | Общие колиформы | 35°C | 24 часа2 | 1,8 раз | Calabrese et al., 1990 |
| Замораживание | Общие колиформы | 20°C | 2 часа | 1,1 раза | Mossel et al., 1980 |

1- Увеличение численности в разы по сравнению с контролем.

2 - Восстанавливающий компонент добавлялся сразу в селективную среду.

**3. Объекты и методы исследования.**

**3.1. Характеристика объекта исследования.**

Объектом исследования была вода морского аквариума № 35 Санкт-Петербургского Океанариума (ТРК «Планета Нептун») – рис. 1.



**Рис. 1.Внешний вид аквариума № 35.**

Вместимость акварума № 35 – 750 тонн. Температура воды 24,50С. Плотность воды 1,023. Значение рН 8,15-8,2. В аквариуме содержится рыба разных размеров (от 12 см до 3 м): зебровые акулы (1,5-1,8 м) – 2 шт, белоперые акулы (1,2-1,3 м) – 4 шт, акулы-няньки (1-1,6 м) – 7 шт, черноперые акулы (1 м) – 9 шт, бамбуковая акула (60 см) – 1 шт, скат хвостокол (1,2 м) – 1 шт, каранги (30-60 см) – 140 шт, гигантские каранксы (70-80 см) – 7 шт, луцианы (15-20 см) – 400 шт, монодактилы (12 см) – 100 шт, цезио (15-20 см) – 50 шт, белоперые кабубы (15 см) – 10 шт, мурены (1-1,3 см) – 4 шт, оливковая черепаха (60 см) – 1 шт.

Режим кормления – 6 раз в неделю (рыба 8,2-8,8 кг, креветки 1 кг, кальмары 0,4-1 кг). Чистка грунта и декораций производится с участием водолазной службы ежедневно утром и вечером. Подмена воды в объеме 30 тонн проводится еженедельно по средам.

Аквариум № 35 - закрытого типа (водная поверхность изолирована от экспозиционного помещения).

Система жизнеобеспечения аквариума является замкнутой. Очистка воды осуществляется несколькими параллельными путями.

- Вода из аквариума по трубопроводу поступает на 2 песчаных фильтра, выполняющих функцию биологической и механической фильтрации, а также камеру дегазации. Из песчаных фильтров вода поступает обратно в аквариум.

- Из камеры дегазации вода поступает в скиммер, где происходит озонирование, и возвращается обратно в камеру дегазации, затем в балансную камеру (буферную емкость). Из балансной камеры вода подается в аквариум.

- Из камеры дегазации вода поступает на 2 угольных фильтра, после чего – в балансную камеру. Из балансной камеры вода поступает в аквариум.

Санация воды происходит за счет обработки озоном. Производительность озонатора составляет 20 г в час.

Пробы воды отбирали в стерильную емкость непосредственно из аквариума.

**3.2. Определение общего микробного числа воды**

Общее микробное число исследуемой воды определяли методом прямого высева исходной воды и десятикратных разведений на питательный агар (HiMedia, Индия). Высев производили в тройной повторности. Культивирование посевов проводили в течение 3 суток при 300С. Для подсчета выбирали чашки с числом колоний не более 300. Полученное число колоний пересчитывали на 1 мл исходной воды и выражали в КОЕ/мл.

**3.3. Титрационный метод оценки численности колиформных бактерий по МУК 4.2.1884-04.**

Для оценки численности колиформных бактерий в исследуемой воде использовали стандартный титрационный метод по МУК 4.2.1884-04. Для этого 10 мл, 1 мл исходной воды, а также ее десятикратные разведения засевали 1:10 в лактозо-пептонную накопительную среду в трехкратной повторности. Инкубацию посевов проводили в течение 22-24 часов при 37оС.

Состав лактозо-пептонной среды накопления (г/л): пептон – 10,0; хлористый натрий – 5,0; лактоза - 5,0; индикатор - 1,6 %-ный спиртовой раствор бромтимолового синего – 2 мл; pH 7,4+0,2.

Колиформные бактерии являются лактозоположительными и сбраживают лактозу с образованием смеси органических кислот. Это приводит к снижению pH и изменению цвета накопительной среды с зеленого на желтый («положительные» пробирки).

Для выделения колиформных бактерий из положительных пробирок были сделаны посевы на диагностическую среду Эндо в чашки Петри. Инкубация посевов проводилась в течение 20-22 часов при 37оС. Колонии колиформных бактерий на среде Эндо имеют малиновый, красный или темно-красный цвет, часто с металлическим блеском.

Состав среды Эндо (г/л): панкреатический гидролизат рыбной муки – 12,0; дрожжевой экстракт – 1,0; натрия хлорид – 3,4; Д-(+)-лактоза – 10,0; натрия сульфит, безводный 0,8; натрия фосфат 3-зам. 12-водный – 0,5; фуксин основной– 0,2; агар – 13,0; рН 7,4+0,2.

Для подтверждения принадлежности подозрительных малиновых колоний к колиформам проверяли их способность к образованию кислоты и газа на лактозо-пептонной среде с поплавками. Инкубацию проводили в течение 22-24 часов при 37оС. Для подтверждения принадлежности изолятов к термотолерантным колиформам засевы инкубировали в течение 22-24 часов при 44оС.

После этого составляли окончательное распределение присутствия/отсутствия колиформных бактерий в накопительных культурах, зашифровывали его и по таблице МакКреди рассчитывали содержание общих и термотолернтных колиформ в воде. Численность выражали в клетках/мл исходной воды.

Присутствие *E.coli* в накопительных культурах определяли по способности подтвержденных изолятов термотолерантных колиформ образовывать индол из триптофана. Для этого проводили засев изолятов в пептонную среду с триптофаном (г/л: пептон – 10,0; хлористый натрий – 5,0; триптофан – 1,0; pH 7,2.). Посевы инкубировали в течение 24 часов при 44оС. Присутствие индола определяли при помощи реактива Ковача (п-диметиламинобензальдегид – 3 г, концентрированная соляная кислота – 25 мл, н-бутанол – 75 мл). В случае присутствия индола на поверхности питательной среды после внесения реактива образуется красное кольцо.

После этого составляли окончательное распределение присутствия/отсутствия *E.coli* в накопительных культурах, зашифровывали его и по таблице МакКреди рассчитывали содержание *E.coli* в воде.

**3.4. Восстановление жизнеспособности колиформных бактерий с обратимыми сублетальными повреждениями.**

Для восстановления жизнеспособности колиформных бактерий использовали готовые коммерческие среды: Maximum Recovery Diluent (забуференная пептонная вода) и Whitley Impedance Broth фирмы Don Whitley (Великобритания), Trypton-soy Yeast Extract Broth и Brain Heart Broth фирмы HiMedia, Индия.

Для проведения восстановления жизнеспособности бактерий среды восстановления готовили в двойной концентрации и добавляли к 10 мл, 1 мл исходной воды и к трем ее десятикратным разведениям в равном объеме. В контроле вместо среды накопления добавляли физиологический раствор. Инкубацию со средами восстановления проводили в течение 1 часа при комнатной температуре (23оС). После этого проводили засев 1:10 в среду накопления.

**3.5. Оценка численности поврежденных клеток колиформных бактерий в санируемой аквариумной воде.**

Численность поврежденных клеток колиформ определяли по увеличению их численности в накопительной селективной среде ColEco (Don Whitley, Великобритания) по сравнению с контролем после проведения процедуры восстановления жизнеспособности, с последующим выявлением колиформ на среде Эндо (п. 3.3.).

Основой среды ColEco является классическая лактозо-пептонная среда МакКонки, содержащая детергент лаурилсульфат натрия, аналогичный по своему действию желчным солям, к которым в норме колиформные бактерии должны проявлять устойчивость. Дополнительно в среду ColEco введен флюорогенный субстрат для одновременного выявления *E.coli* по ß-глюкуронидазной активности.

Лактозо-пептонная среда накопления, используемая в стандартном методе выявления колиформ по МУК 4.2.1884-04, не является селективной и, по нашим предположениям может хотя бы частично восстанавливать жизнеспособность колиформных бактерий на стадии накопления. Для проверки этого предположения проводили эксперимент по восстановлению жизнеспособности колиформ санируемой воды, как это описано выше, с последующим засевом в среду накопления – лактозо-пептонный бульон 1:10.

**3.6. Оценка влияния слизеобразующих бактерий санируемой аквариумной воды на эффективность выявления колиформных бактерий.**

Слизеобразующие бактерии иногда накапливаются в лактозо-пептонном бульоне вместе с колиформами в виде пленки на поверхности накопительной культуры. На среде Эндо они образуют слизистые, растекающиеся колонии светло-розового цвета.

Изоляты слизеобразующих бактерий отсевали со среды Эндо и очищали клонированием на питательном агаре.

Для постановки экспериментов выращивали культуру слизеобразующих бактерий в лактозо-пептонном бульоне при 37оС в течение 24 часов. Оценку исходной численности бактерий в бульонной культуре определяли высевом на питательный агар.

Для оценки влияния слизеобразующих бактерий на эффективность выделения колиформ делали разведения бульонной культуры в физиологическом растворе.

Слизеобразующие бактерии добавляли в аквариумную воду в количестве 500, 1000, 2500 и 5000 клеток/100 мл перед стадией восстановления жизнеспособности бактерий в TSY – бульоне.

Далее содержание колиформных бактерий проводили по п.3.3.

**3.7. Повышение эффективности выявления колиформ по стандартной методике МУК 4.2.1884-04.**

**3.7.1. Оценка влияния варианта засева (степени разбавления) на эффективность выявления колиформ в аквариумной воде.**

Для оценки влияния варианта засева 10:1 в накопительную среду 10 мл исходной воды были засеяны в накопительную лактозо-пептонную среду двух вариантах: 1:10 (10 мл воды и 100 мл накопительной среды) и 10:1 (10 мл воды и 1 мл концентрированной накопительной среды). Меньшие объемы засевали в соотношении 1:10 в лактозо-пептонный бульон стандартной концентрации.

**3.7.2. Достоверность подтверждения принадлежности изолятов колиформ к виду *E.coli* в соответствии с МУК 4.2.1884-04.**

В соответствии с МУК 4.2.1884-04 определение содержания *E.coli* проводилось для изолятов термотолерантных колиформ по образованию индола из триптофана (гл. 3.3.) и по образованию кислоты и газа в лактозопептонном бульоне с борной кислотой.

Для оценки содержания *E.coli* по борной кислоте подтвержденные изоляты термотолерантных колиформ высевали в прогретый лактозо-пептонный бульон с борной кислотой.

Состав лактозопептонного бульона с борной кислотой (г/л): пептон – 10,0; калий фосфорнокислый двузамещенный (безводный) – 12,2; калий фосфорнокислый однозамещенный (безводный) – 4,1; борная кислота – 3,2; лактоза – 5,0. Инкубацию посевов проводили при 44оС в течение 24 часов.

Присутствие *E.coli* проверялось по наличию признаков роста и появлению газа в поплавках. На основании результатов составляли окончательное распределение присутствия/отсутствия *E.coli* в накопительных культурах, зашифровывали его и по таблице МакКреди рассчитывали содержание *E.coli* в воде.

**4. Результаты и их обсуждение.**

**4.1. Микробиологические показатели исследованной аквариумной воды в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.5.980-00.**

Вода аквариумов с гидробионтами имеет низкое общее микробное число (3,0 -7,0 х 102 КОЕ/мл). В то же время, несмотря на непрерывную санацию, в этой воде выявляется значительное количество общих колиформных бактерий 250-640 клеток/100 мл воды (Аламмар, 2017; настоящее исследование, 2018).

Для оценки гигиенического состояния воды океанариумов в РФ отсутствует нормативный документ, учитывающий специфические особенности данных объектов (замкнутый цикл очистки, непрерывная санация). Поэтому гигиеническое состояние воды Океанариумов оценивается в соответствии с требованиями, предъявляемыми к другим водным объектам, в частности к водоемам рекреационного пользования (СанПиН 2.1.5.980-00) – общие колиформы – не более 500 клеток/100мл, термотолерантные колиформы – не более 100 клеток/100 мл.

В силу неадекватности используемых нормативов и невозможности их соблюдения была сделана попытка перейти на оценку гигиенического состояния по другим показателям, в частности по содержанию в воде *E.coli* (Вирджинский аквариум в США) (Virginia Aquarium Water Quality Parameters Explained, 2016).

Тем не менее, по данным нашей группы (Аламмар, 2017), в воде аквариумов замкнутого цикла с непрерывной санацией очень низкое содержание *E.coli*. В воде преобладают слизеобразующие и сероводород образующие колиформные бактерии родов Klebsiella и Citrobacter (Аламмар, 2017).

Низкое, на пределе выявления, содержание E.coli в непрерывно санируемой воде может быть результатом снижения жизнеспособности бактериальных клеток, замедления физиологических ответов в идентификационных тестах, снижение конкурентной способности *E.coli* на стадии накопления, что в целом приводит к ложноотрицательному ответу об отсутствии *E.coli*. Таким образом, следует констатировать, что вопрос о применимости тех или иных гигиенических показателей для аквариумной воды в непрерывном режиме санации остается открытым.

Для обоснованного выбора адекватного микробиологического показателя для оценки гигиенического состояния непрерывно санируемой воды аквариумов следует изучить следующие вопросы:

- оценить степень снижения жизнеспособности бактерий в результате санации и возможность восстановления сублетальных повреждений.

- подобрать оптимальный режим восстановления жизнеспособности бактерий в аквариумной воде и включить этап восстановления в стандартную методику выявления колиформ, регламентированную Методическими указаниями (МУК 4.2.1884-04);

- оптимизировать этапы выявления колиформ и *E.coli* по МУК 4.2.1884-04 с учетом особенностей смешанной бактериальной популяции в непрерывно санируемой аквариумной воде для повышения эффективности выявления колиформ и *E.coli*.

Результаты данной работы изложены в следующих главах.

**4.2. Численность колиформных бактерий с сублетальными повреждениями в санируемой аквариумной воде и восстановление их жизнеспособности.**

Для оценки числа колиформ с сублетальными повреждениями мы провели их выявление в стандартной среде накопления ColEco (Whithley Co., Великобритания), содержащей бычью желчь. По устоявшимся представлениям все энтеробактерии устойчивы к используемым концентрациям желчных солей.

Для восстановления жизнеспособности поврежденных клеток проводили часовую инкубацию аликвот со средой восстановления (высокопитательные бульоны с дрожжевым экстрактом и глюкозой) (Ray, 1989).

Мы оценивали количество поврежденных клеток и эффективность процедуры восстановления по увеличению численности выявляемых общих и термотолерантных колиформ и *E.coli*. Результаты представлены в табл. 3.

**Таблица 3.**

**Содержание колиформных бактерий и E.coli в аквариумной воде до и после восстановления с последующим их накоплением в среде ColEco**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Микробиологические показатели | Содержание бактерий в аквариумной воде (кл/100 мл)1 | | | | |
| До восста-новления | После восстановления жизнеспособности в следующих средах: | | | |
| Maximum Recovery Diluent | Whitley Broth | Trypton-soy Yeast Extract Broth | Brain Heart Broth |
| Общие колиформные бактерии | менее  3 кл | 100 | 250 | 250 | 30 |
| Термотолерантные колиформные бактерии | 50 | 100 | 20 | Менее 3 |
| *E.coli*2 | 75 | 450 | 250 | 9500 |

1 – ОМЧ воды составило 3 х 102 КОЕ/мл.

2 - содержание *E.coli* оценивали по флуоресценции среды ColEco при облучении УФ.

Полученные результаты показывают, что в санируемой воде численность колиформ, не выявляемых в результате сублетальных повреждений, но способных к восстановлению, очень высокая (табл. 4) и составляет 85-100%. Данный факт был установлен впервые, подобные исследования ранее никем не проводились.

**Таблица 4.**

**Доля колиформных бактерий с сублетальными повреждениями в аквариумной воде при их выявлении в среде ColEco**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Микробиологические показатели | %% колиформ до восста-новления | %% колиформ с сублетальными повреждениями в воде1, санируемой озоном и УФ после восстановления жизнеспособности в следующих средах: | | | |
| Maximum Recovery Diluent | Whitley Broth | Trypton-soy Yeast Extract Broth | Brain Heart Broth |
| Общие колиформные бактерии | 100% | 97,0 | 98,8 | 98,8 | 90,0 |
| Термотолерантные колиформные бактерии | 100% | 94,0 | 97,0 | 85,0 | 0,0 |
| *E.coli*2 | 100% | 96,0 | 99,3 | 98,8 | 99,97 |

1 –ОМЧ воды до восстановления жизнеспособности составило 3 х 102 КОЕ/мл .

2 - содержание *E.coli* оценивали по флуоресценции среды ColEco при облучении УФ.

Полученные данные о высокой численности жизнеспособных, но поврежденных колиформ диктуют необходимость корректировки методики их выявления как санитарно-показательных бактерий при оценке гигиенического состояния воды аквариумов. Очевидно, что процедура восстановления сублетальных повреждений должна стать обязательным этапом при микробиологическом анализе непрерывно санируемой аквариумной воды. В качестве среды восстановления по нашим данным можно рекомендовать эффективный и наиболее доступный триптиказо-соевый бульон с дрожжевым экстрактом – TSY-broth (табл. 4).

По международному стандарту ISO 9308-2:2012(2014) численность колиформ в воде проводится в среде накопления Colilert 18, в которую введены жесткие селективные компоненты: сульфит и антибиотики – цефсулодин (производное цефалоспорина) и ванкомицин для подавления роста энтерококков и Pseudomonas aeruginosa. Можно прогнозировать, что в случае анализа непрерывно санируемой воды процедура восстановления жизнеспособности существенно повысить численность колиформ при использовании среды Colilert 18.

Выявление колиформных бактерий в образцах воды по действующему российскому методическому документу МУК 4.2.1884-04 проводят в неселективном лактозо-пептонном бульоне, то есть в более мягких условиях в отношении травмированных клеток. Факторами, ограничивающими рост посторонних сапрофитных бактерий, являются температура (370С) и короткое время инкубации. Можно ожидать, что процедура восстановления повреждений у бактерий также сможет повысить выявляемость колиформ и в этих условиях. Результаты проверки этого предположения представлены в следующем разделе.

**4.3. Влияние процедуры восстановления жизнеспособности на численность колиформных бактерий, выявляемых по МУК 4.2.1884-04.**

Для оценки количества поврежденных колиформных бактерий по МУК 4.2.1884-04 был поставлен контрольный опыт без восстановления, а также опыты с восстановлением жизнеспособности. Для восстановления использовали 4 вышеназванные среды восстановления с временем инкубации в них исследуемой воды в 1 час.

Накопление колиформ согласно МУК 4.2.1884-04 проводили в неселективном (в отличие от среды ColEco) лактозо-пептонном бульоне.

Содержание колиформных бактерий в аквариумной воде и их доля по сравнению с контролем до и после восстановления жизнеспособности представлены в табл. 5 и 6.

**Таблица 5.**

**Содержания колиформных бактерий и E.coli в образцах аквариумной воды до и после восстановления с последующим их накоплением в лактозо-пептонном бульоне**

**(МУК 4.2.1884-04)**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Микробиологические показатели | Содержание бактерий в аквариумной воде (кл/100 мл)1 | | | | |
| До восста-новления (контроль) | После восстановления жизнеспособности в следующих средах | | | |
| Maximum Recovery Diluent | Whitley Broth | Trypton-soy Yeast Extract Broth | Brain Heart Broth |
| Общие колиформные бактерии | 95-250 | 950 | 950 | 200-350 | 450 |
| Термотолерантные колиформные бактерии | <33 | <33 | 40 | <33 - 45 | 70 |
| *E.coli*2 | <33 | <33 | <33 | <33 | <33 |

1 – ОМЧ воды до восстановления составило 2,6 х 102 КОЕ/мл.

2 - содержание *E.coli* в воде было оценено по способности к образованию индола из триптофана в соответствии с МУК 4.2.1884-04 .

**Таблица 6.**

**Увеличение доли колиформных бактерий в аквариумной воде1, после стадии восстановления с последующим их накоплением в лактозо-пептонном бульоне**

**(МУК 4.2.1884-04)**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Микробиологические показатели | Контроль -  доля колиформ, выявлемых без стадии восстановления | Увеличение доли колиформ, выявляемых после стадии восстановления жизнеспособности в следующих средах: | | | |
| Maximum Recovery Diluent | Whitley Broth | Trypton-soy Yeast Extract Broth | Brain Heart Broth |
| Общие колиформные бактерии | 1,0 | **3,8** | **3,8** | **0,8 - 3,7** | **1,8** |
| Термотолерантные колиформные бактерии | 1,0 | 1,0 | не менее **1,2** | **1,0-1,4** | Не менее **2,1** |
| *E.coli*2 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

1 – ОМЧ воды до восстановления составило 2,6 х 102 КОЕ/мл.

2 - содержание *E.coli* в воде оценивали по способности к образованию индола из триптофана в соответствии с МУК 4.2.1884-04 .

Из табл. 5 видно, что стадия восстановления жизнеспособности привела к увеличению численности колиформ, выявляемых в лактозо-пептонном бульоне по сравнению с контролем в 2-4 раза. Эффект восстановления жизнеспособности колиформ при накоплении в лактозо-пептонном бульоне заметно ниже, чем в среде ColEco (табл. 6). После восстановления увеличилась численность общих колиформ (в 1,8-3,8 раза). В отношении термотолерантных колиформ восстановление жизнеспособности привело к увеличению их численности в 2 раза и менее. Стадия восстановления не повлияла на выявляемость E.coli. Низкие эффекты восстановления можно объяснить способностью самого лактозо-пептонного бульона ЧАСТИЧНО восстанавливать жизнеспособность поврежденных колиформных бактерий. Несмотря на это, актуальность проведения процедуры восстановления остается без сомнений.

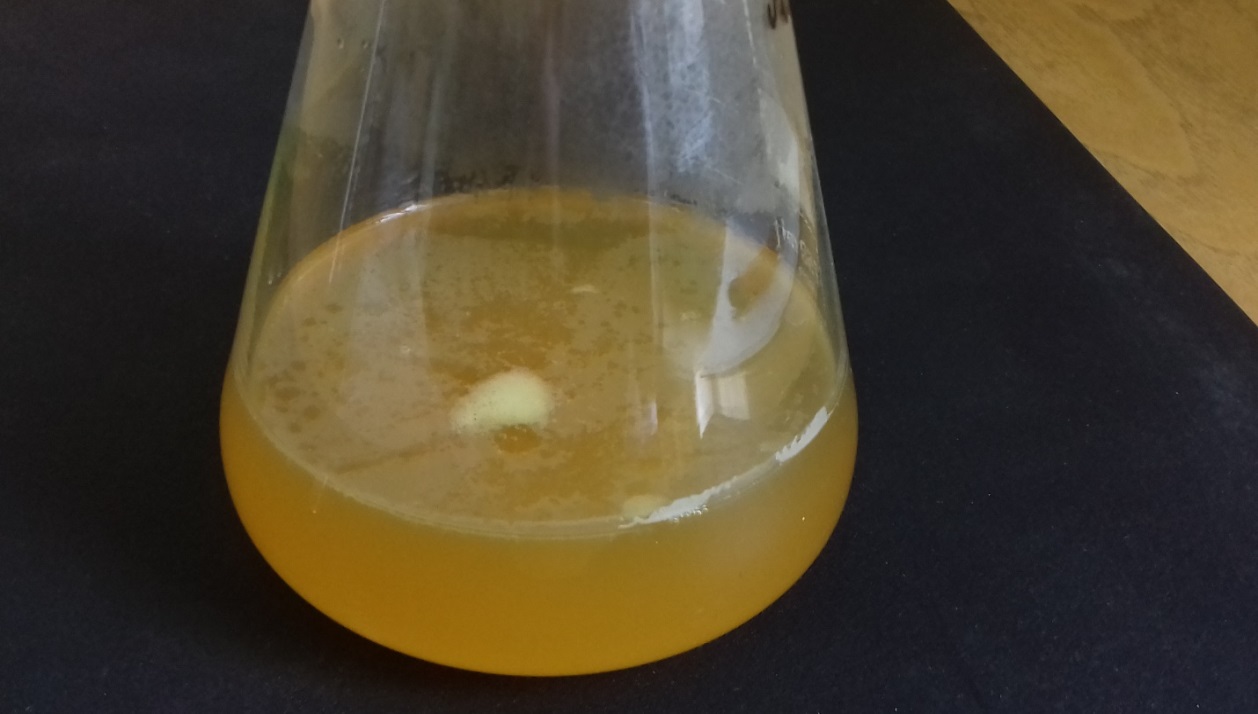
По требованиям СанПиН 2.1.5.980-00 в воде рекреационных водоемов содержание общих и термотолерантных колиформ не должно превышать 500 КОЕ/100 мл и 100 КОЕ/100 мл соответственно. В контрольном опыте содержание колиформ и E.coli не превысило нормативных значений. Однако после восстановления повреждений на средах Maximum Recovery Diluent и Whitley Broth содержание общих колиформ в воде превысило норматив почти в 2 раза, а при восстановлении в среде Brain Heart Broth численность колиформ оказалась близкой к предельно допустимой. Содержание термотолерантных колиформ во всех поставленных опытах не превысило нормативных значений, однако на среде Brain Heart Broth численность колиформ 70 кл/100мл также оказалась близкой к границе норматива.

Таким образом, полученные результаты показывают, что выявление колиформ в санируемой аквариумной воде в лактозо-пептонном бульоне по МУК 4.2.1884-04 может давать заниженные результаты из-за наличия у бактерий повреждений.

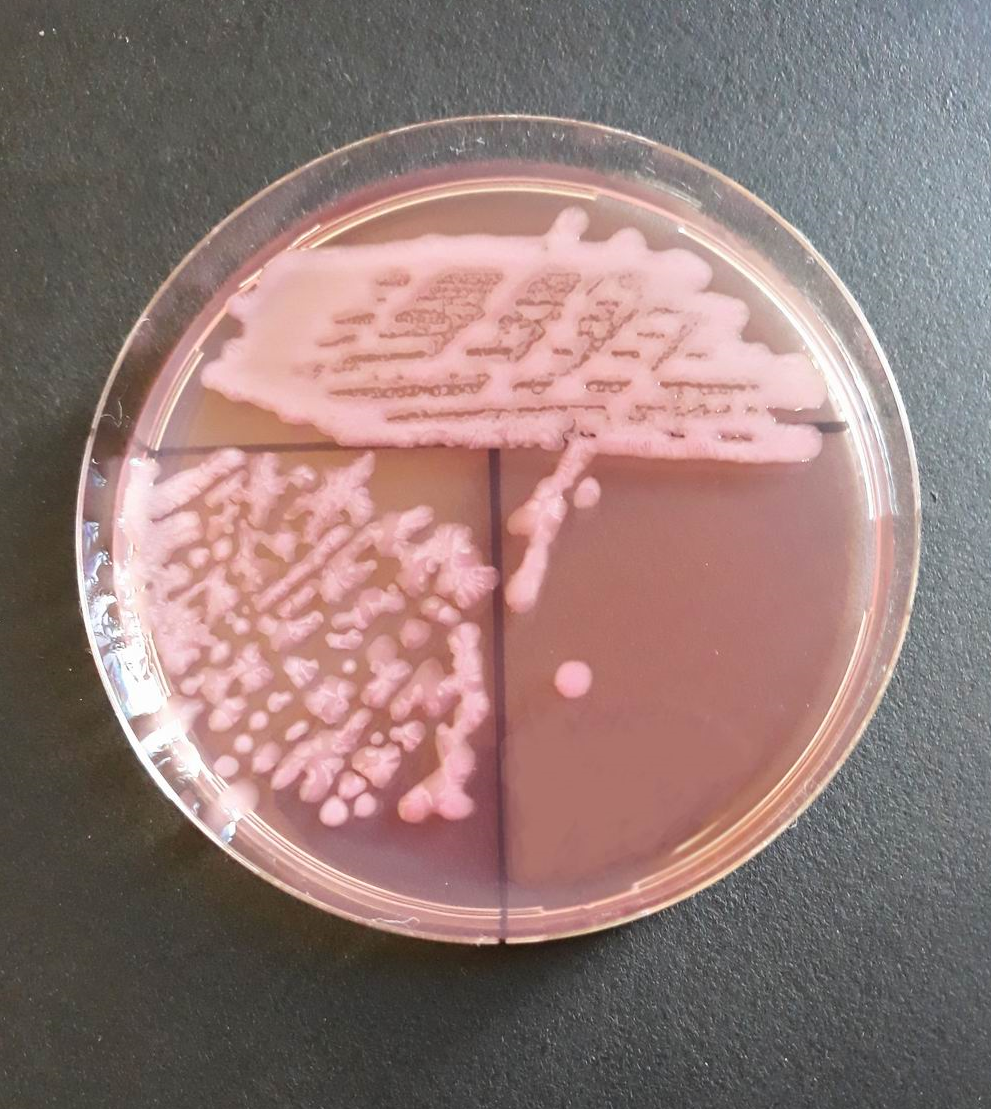
При инкубации исследуемой воды в средах для восстановления происходит репарация повреждений не только у колиформ, но и у сопутствующих посторонних слизеобразующих бактерий. Результаты по изучению их влияния на накопление колиформ в лактозо-пептонном бульоне будут представлены в следующей главе.

**4.4. Влияния слизеобразующих бактерий санируемой аквариумной воды на выявление колиформных бактерий после восстановления их жизнеспособности.**

Непрерывная санация озоном и УФ приводит к обогащению микробиоты аквариумной воды слизеобразующими бактериями (Klebsiella, Pseudomonas, Acinetobacter. Они способны образовывать слизистую пленку на поверхности среды накопления (рис. 2) и сильно ее подщелачивать. На среде Эндо эти бактерии растут с образованием слизистых крупных, расплывающихся, иногда капающих лактозо-отцательных колоний, мешающих выявлению колоний колиформ (рис. 3).

****

**Рис. 2.** **Внешний вид пленки слизеобразующих бактерий на поверхности лактозо-пептонного бульона.**

****

**Рис. 3. Внешний вид слизеобразующих бактерий на среде Эндо после накопления в лактозо-пептонном бульоне.**

Можно предположить, что введение стадии восстановления жизнеспособности микробиоты аквариумной воды может привести к вытеснению колиформ слизеобразующими бактериями на стадии накопления и получение заниженного результата по определению численности колиформ.

Для проверки этого предположения мы выделили слизеобразующих бактерий со среды Эндо и очистили их клонированием. Бульонную культуру слизеобразующих бактерий в количестве 500-5000 КОЕ/100 мл добавляли к аквариумной воде, прошедшей восстановление в TSY- бульоне. Далее выявление колиформ проводили по МУК 4.2.1884-04. Результаты представлены в табл. 7.

**Таблица 7.**

**Влияние содержания слизеобразующих бактерий на выявление колиформ в аквариумной воде после процедуры восстановления в TSY-бульоне**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Микробиологические показатели | Содержание колиформных бактерий в аквариумной воде  (кл/100 мл)1 | | | | |
| Без добавления слизеобразующих бактерий (контроль) | при добавлении слизеобразующих бактерий в концентрациях (КОЕ/100 мл): | | | |
| 500 | 1000 | 2500 | 5000 |
| Общие колиформные бактерии | 95 | 45 | 30 | 30 | 20 |
| Термотолерантные колиформные бактерии | 45 | 25 | 7 | 15 | 9 |
| *E.coli*2 | 10 | 15 | 14 | 15 | 9 |

1 - содержание колиформ и *E.coli* проводили по МУК 4.2.1884-04, подтверждение принадлежности к *E.coli* оценивали по способности изолятов образовывать индол из триптофана; ОМЧ воды до восстановления составило 3,0 х 102 КОЕ/мл.

Из табл. 7 видно, что выявляемость общих и термотолерантных колиформных бактерий в санируемой воде существенно снижается при возрастании численности слизеобразующих бактерий. При возрастании концентрации слизеобразующих бактерий с 500 КОЕ/100 мл воды до 5000 КОЕ/100 мл воды обнаруживаемая численность общих и термотолерантных колиформ снизилась более чем в 2 раза по сравнению с контролем. Численность E.coli в присутствии слизеобразующих бактерий существенно не изменилась.

Образование слизи приводит к слипанию клеток, что снижает агрессивное воздействие санации на жизнеспособность бактерий, с другой стороны слизеобразующие бактерии снижают активность сбраживания лактозы колиформными бактериями и замедляют снижение рН в среде накопления и на среде Эндо. Это приводит к изменению внешнего вида колоний колиформ, из малиновых они становятся розовыми. Это затрудняет их выявление на среде Эндо и, как следствие, занижает окончательную численность.

Способность бактерий, сопутствующих колиформам в санируемой воде, мешать их выявлению классическим методом диктует необходимость корректировки метода с учетом специфических особенностей микробиоты аквариумной воды.

**4.5. Оптимизация этапов выявления колиформ и E.coli по МУК 4.2.1884-04 с учетом особенностей микробиоты санируемой аквариумной воде**

**4.5.1. Влияние способа засева в накопительную среду на эффективность выявления колиформ и *E.coli***

Введение процедуры восстановления жизнеспособности приводит к активизации бактерий, сопутствующих колиформам в санируемой аквариумной воде. При проведении стадии накопления в неселективном лактозо-пептонном бульоне по МУК 4.2.1884-04 следует учитывать жесткие конкурентные взаимоотношения бактерий и провести корректировку отдельных этапов.

Так, согласно МУК 4.2.1884-04, при анализе проб воды по 10 мл рекомендуется вместо засева в накопительную среду в соотношении 1:10 проводить засев в соотношении 10:1 (10 мл воды и 1 мл концентрированной накопительной среды). Ранее в эксперименте нами было отмечено, что в присутствии слизеобразующих бактерий при засеве воды в лактозо-пептонный бульон 10:1 колиформы образовывали на среде Эндо бледно розовые нехарактерные колонии. При засеве 1:10 колиформы давали характерные темно-малиновые колонии с металлическим блеском (рис. 4).

Мы провели количественную оценку снижения численности колиформ и E.coli с процедурой восстановления и без нее (контроль) при засеве воды в соотношении 10:1. Результаты представлены в табл. 8.

Результаты эксперимента показали, что независимо от проведения процедуры восстановления при засеве воды в накопительную среду 10:1 эффективность выявления общих и термотолерантных колиформ существенно снижается по сравнению с засевом 1:10. Таким образом, в случае анализа образцов непрерывно санируемой воды замкнутых систем недопустимо проводить засев в накопительную среду в соотношении 10:1.



**Рис. 4. Внешний вид колиформных бактерий на среде Эндо при различном способе засева в среду накопления (лактозо-пептонный бульон) в присутствии слизеобразующих бактерий (начальная концентрация – 500 КОЕ/100 мл воды).**

**Таблица 8.**

**Влияние процедуры восстановления1 жизнеспособности и способа засева в накопительную среду на содержание колиформ и *E.coli* в непрерывно санируемой аквариумной воде**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Микробиологические показатели | Содержание бактерий в аквариумной воде (кл/100 мл) | | | |
| Без восстановления | | С восстановлением | |
| Засев 1:10 | Засев 10:1 | Засев 1:10 | Засев 10:1 |
| Общие колиформные бактерии | 450 | Не выявлены в 3х10 мл | 95 | 6 |
| Термотолерантные колиформные бактерии | 35 | Не выявлены в 3х10 мл | 95 | Не выявлены в 3х10 мл |
| *E.coli* (индол) | 15 | \_ | 95 | \_ |

1. Восстановление проводили в TSY-бульоне в течение 60 минут при комнатной температуре; ОМЧ воды составило 7,2 х 102 КОЕ/мл.

**4.5.2. Достоверность подтверждения принадлежности изолятов колиформ к виду E.coli в соответствии с МУК 4.2.1884-04 .**

По результатам, представленным выше в табл. 5, 6 и 7 содержание *E.coli* в исследованной санируемой аквариумной воде низкое и составляет единичные клетки на 100 мл. В то же время норматив Вирджинского Океанариума по показателю *E.coli* – 235 клеток/100 мл. Возникает сомнение в достаточной эффективности выявления *E.coli* по методике МУК 4.2.1884-04 при анализе санируемой аквариумной воды в сравнении с международными стандартами.

Действительно, результаты наших предыдущих исследований (Аламмар, 2017) показывают, что даже если присутствие E.coli установлено в анализируемой воде по МУК 4.2.1884-04, выделяемые изоляты колиформ невозможно отнести к виду *E.coli* по результатам классической идентификации. В составе колиформ выявлялись преимущественно *Citrobacter* и *Klebsiella*. В 2018 г в нашей группе в работе Начи Паолы (Начи, 2018) было показано, что E.coli не удается выявить даже после восстановления жизнеспособности бактерий (TSY-бульон) в аквариумной воде с теплокровными животными (Начи П., 2018).

Для того, чтобы понять причины этих несоответствий мы сравнили признаки вида E.coli в МУК 4.2.1884-04 и ISO 9308-2:2014, они представлены в табл. 9.

**Таблица 9.**

**Признаки изолятов колиформ, позволяющие отнести их к виду *E.coli*, в соответствии с МУК 4.2.1884-04 и ISO 9308-2:2014**

|  |  |
| --- | --- |
| **МУК 4.2.1884-04 (Приложение 4)** | **ISO 9308-2:2012 (Приложение А)** |
| 1. Образование кислоты и газы в лактозном бульоне при 440С за 24 часа (β-D-галакто-зидаза);  2. Образование индола из триптофана при 440С за 24 часа; альтернативный метод – помутнение и образование газа в лактозном бульоне с борной кислотой (0,3%) при 440С за 24 часа. | 1. β-D-глукуронидаза (флюорогенные и хромогенные среды накопления);  2. β-D-галактозидаза - образование кислоты и газы в лактозном бульоне при 370С за 48 часа;  3. Образование индола из триптофана при 440С за 24 часа;  4. Тест «метил-рот» - положительный;  5. Реакция Фогеса-Проскауэра (образование ацетил-метил-карбинола) – отрицательная;  6. Отсутствие способности утилизировать цитрат и расти в присутствии KCN. |

Данные табл. 9 позволяют заключить, что границы вида *E.coli* в российском документе более широкие, чем в международном стандарте. Известно (Brenner et al., 2005),что способностью образовывать индол из триптофана обладают колиформные бактерии родов *Citrobacter, Klebsiella* и др. Они способны размножаться при температуре, близкой к 440С. Некоторые слизеобразующие псевдомонады, например *Ps.aeruginosa*, также могут размножаться при 420C, в их присутствии ограничивающее значение температурного фактора будет смягчаться. Это объясняет, почему нам удается установить минимальную численность *E.coli* в аквариумной воде, но не удается подтвердить принадлежность выделенных изолятов к виду *E.coli* в результате идентификации.

Таким образом, можно констатировать, что полученные нами даже низкие значения численности *E.coli* в аквариумной воде скорее всего завышенные. *E.coli* практически вытеснена из популяции более устойчивыми колиформными бактериями. Для получения реальных значений по ее численности следует проводить более расширенное тестирование изолятов (тест с метил-рот, реакцию Фогеса-Проскауера и способность потреблять цитрат).

Высокие значения предельно-допустимого содержания *E.coli* в аквариумной воде в Вирджинском аквариуме, как следует из текста оригинального документа (Virginia Aquarium Water Quality Parameters Explained, 2016), заимствованы из нормативов для плавательных бассейнов. Применение такого норматива к аквариумам с гидробионтами при непрерывном обороте и санации воды в СтПетербургском океанариуме кажется недостаточно обоснованным.

Специфические особенности колиформных бактерий аквариумной воды в условиях непрерывной санации требуют проведения еще одной корректировки методики МУК 4.2.1884-04. В частности в МУК указана возможность замены теста на образование индола более простым методом выявления по помутнению и газообразованию в лактозо-пептонном бульоне в присутствии борной кислоты (440С, 24 часа). В нашей работе было показано, что из 27 индол-положительных штаммов только 2 штамма дают помутнение и газ в лактозном бульоне при 440С за 24 часа культивирования. Таким образом, эти два теста не являются взаимозаменяемыми при оценке содержания *E.coli* при анализе аквариумной воды в замкнутом обороте при непрерывной санации. Для подтверждения принадлежности изолятов к виду *E.coli* следует обязательно проводить проверку способности образовывать индол из триптофана.

**4.6. Обсуждение и заключение.**

Таким образом, в данной работе показано, что аквариумная вода СтПетербургского Океанариума, находящаяся в замкнутом обороте при непрерывной санации озоном и УФ-облучением содержит колиформных бактерий, отличающихся по свои свойствам от колиформных бактерий воды открытых водоемов. Колиформные бактерии в исследованной воде характеризуются:

- наличием у 99% клеток колиформ обратимых сублетальных повреждений;

- отсутствием в группах общих и термотолерантных колиформ бактерий вида *E.coli.*

Из этого следует, что аквариумная вода в замкнутом обороте и непрерывной санации является специфическим объектом гигиенического контроля, требующим разработки адаптированных методов микробиологического анализа и специфических, индивидуальных критериев гигиенического состояния.

При разработке методов микробиологического контроля и критериев гигиенического состояния воды Океанариумов необходимо обязательно ввести в практику стадию восстановления жизнеспособности бактериальных клеток, независимо от типа накопительной среды.

Для количественной оценки гигиенического состояния аквариумной воды рекомендуется отказаться от показателя «*E.coli*», как несостоятельного в отношении данных объектов контроля.

Для показателей «общие и термотолерантные колиформы» (при проведении процедуры восстановления жизнеспособности бактерий) целесообразно разработать новые нормативы, выше тех, что используются для воды открытых водоемов.

**5. Выводы.**

1. Колиформные бактерии аквариумной воды в замкнутой системе очистки с режимом непрерывной санации характеризуются высоким уровнем обратимых сублетальных повреждений, достигающим 99% их численности.

2. В условиях непрерывной санации в аквариумной воде увеличивается численность слизеобразующих бактерий, снижающих эффективность выявления колиформных бактерий на стадии накопления в неселективных накопительных средах.

3. При выявлении E.coli в санируемой аквариумной воде недопустимо заменять тест «образование индола из триптофана» на тест «газообразование в лактозном бульоне» при 440С за 24 часа.

1. **Список научной литературы.**
2. Аламмар Виждан Ахмед, 2017. Разнообразие колиформных бактерий в непрерывно санируемой аквариумной воде. Выпускная квалификационная работа магистра, СПбГУ.
3. Ермилова Е. В., 2012. Молекулярные аспекты адаптации прокариот. Издательство «Химиздат», СПб.
4. Калина Г.П., 1969. Санитарная микробиология. Издательство «Медицина», М.
5. Кузьмина В.В., Золотарева Г.В., Шептицкий В.А., Филипенко С.И. 2016. Роль объектов питания и микробиоты в процессах пищеварения рыб из разных экосистем. Тирасполь, Изд-во Приднестровского университета.
6. Мецлер Д., 1980. Биохимия. Т. 2. Издательство «Мир», М.
7. МУК 4.2.1884-04. Методические указания. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов.
8. Начи П., 2018. Санитарно-показательные бактерии в аквариумах с различными гидробионтами в условиях замкнутых систем очистки и непрерывной санацией воды. Выпускная квалификационная работа бакалавра, СПбГУ.
9. Прокофьев E. C., 2017. Содержание представителей рода Mycobacterium в воде и обрастаниях аквариумов с замкнутой системой очистки воды. Выпускная квалификационная работа бакалавра, СПбГУ.
10. СанПиН 2.1.2.1331-03 Гигиенические требования к устройству, эксплуатации и качеству воды аквапарков.
11. СанПиН 2.1.5.980-00. 2.1.5. Водоотведение населенных мест, санитарная охрана водных объектов. Гигиенические требования к охране поверхностных вод. Санитарные правила и нормы" с изм. на 2011 г.
12. ФАO., 2016. Cостояние мирового рыболовства и аквакультуры, 2016. Вклад в обеспечение всеобщей продовольственной безопасности и питания. ФАО, Рим.
13. Arpai J., 1964. On the recovery of bacteria from freezing. Journal of Basic Microbiology, V. 4, №. 2, p. 105-113.
14. Basler C., Bottichio L., Higa J., Prado B., Wong M., Bosch S., 2015. Multistate Outbreak of Human Salmonella Poona Infections Associated with Pet Turtle Exposure - United States, 2014. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), V. 64, №. 29, p. 804-804.
15. Bregnballe J., 2015. A guide to recirculation aquaculture. An introduction to the new environmentally friendly and highly productive closed fish farming systems. FAO.
16. Brenner D.J., Farmer J.J. III., 2005. Family I. Enterobacteriaceae. In: Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, vol. 2 The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria, p.587-850.
17. Byamukama D., Kansiime F., Mach R. L., Farnleitner A. H., 2000. Determination of Escherichia coli contamination with chromocult coliform agar showed a high level of discrimination efficiency for differing fecal pollution levels in tropical waters of Kampala, Uganda. Applied and Environmental Microbiology, V. 66, №. 2, p. 864-868.
18. Calabrese J. P., Bissonnette G. K., 1990. Improved membrane filtration method incorporating catalase and sodium pyruvate for detection of chlorine-stressed coliform bacteria. Applied and Environmental Microbiology, V. 56, №. 11, p. 3558-3564.
19. Campbell L. M., Michaels G., Klein R. D., Roth I. L., 1976. Isolation of Klebsiella pneumoniae from lake water. Canadian Journal of Microbiology, V. 22, №. 12, p. 1762-1767.
20. Fakruddin M., Mannan K. S. B., Andrews S., 2013. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. ISRN microbiology, V. 2013, p.1-6.
21. Ford D. M., 1981. The hobby of ornamental fishkeeping. Journal of Small Animal Practice, V. 22, №. 6, p. 317-322.
22. Fukao T., Ohta Y., 1998. Influence of Hop Resins on Freeze Injury to Escherichia coli. Food Science and Technology International, Tokyo, V. 4, №. 4, p. 300-303.
23. Geldreich E. E., Bordner R. H., Huff C. B., Clark H. F., Kabler P. W., 1962. Type distribution of coliform bacteria in the feces of warm-blooded animals. Water Pollution Control Federation, V.34, №. 3, p. 295-301.
24. Grabow W. O. K., Hilner C. A., Coubrough P., 1981. Evaluation of standard and modified M-FC, MacConkey, and Teepol media for membrane filtration counting of fecal coliforms in water. Applied and Environmental Microbiology, V. 42, №. 2, p. 192-199.
25. Ishii S., Sadowsky M. J., 2008. Escherichia coli in the environment: implications for water quality and human health. Microbes and Environments, V. 23, №. 2, p. 101-108.
26. ISO 9308-2:2012 (2014). International Standard. Water quality. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 2: Most probable number method. Second edition.
27. Kapuscinski R. B., Mitchell R., 1981. Solar radiation induces sublethal injury in Escherichia coli in seawater. Applied and Environmental Microbiology, V. 41, №. 3, p. 670-674.
28. Kho. K., Ng, W. J., Ho L. M., Ong S. L., Sim T. S., Tay S. H., Goh C. C., Cheong L., 1992. Water quality within a recirculating system for tropical ornamental fish culture. Aquaculture, V. 103, №. 2, p. 123-134.
29. King R. K., Flick Jr G. J., Pierson D., Smith S. A., Boardman G. D., Coale Jr C. W., 2004. Identification of bacterial pathogens in biofilms of recirculating aquaculture systems. Journal of Aquatic Food Product Technology, V. 13, №. 1, p. 125-133.
30. Kitao T., Aoki T., 1976. Microbial flora of artificial fish diets. Fish Pathology, V. 10, №. 2, p. 181-185.
31. Kuo S. C., MacLeod R. A., 1969. Capacity of aspartic acid to increase the bacterial count on suspensions of Escherichia coli after freezing. Journal of Bacteriology, V. 98, №. 2, p. 651-658.
32. Lafuente S., Bellido J. B., Moraga F. A., Herrera S., Yagüe A., Montalvo T., Simó M., Simón P., Caylà, J. A., 2013. Salmonella paratyphi B and Salmonella litchfield outbreaks associated with pet turtle exposure in Spain. Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica, V. 31, №. 1, p. 32-35.
33. Lamm S. H., Taylor A. JR, Gangarosa E. J., Anderson H. W., Young W., Clark M. H., Bruce A. R., 1972. Turtle-associated salmonellosis: I. An estimation of the magnitude of the problem in the United States, 1970–1971. American Journal of Epidemiology, V. 95, №. 6, p. 511-517.
34. Liltved H., Hektoen H., Efraimsen H., 1995. Inactivation of bacterial and viral fish pathogens by ozonation or UV irradiation in water of different salinity. Aquacultural Engineering, V. 14, №. 2, p. 107-122.
35. Liltved H., Vogelsang C., Modahl I., Dannevig B. H., 2006. High resistance of fish pathogenic viruses to UV irradiation and ozonated seawater. Aquacultural Engineering, V. 34, №. 2, p. 72-82.
36. Mahfoudh A., Moisan M., Seguin J., Barbeau J., Kabouzi Y., Keroack D., 2010. Inactivation of vegetative and sporulated bacteria by dry gaseous ozone. Ozone: Science & Engineering, V. 32, №. 3, p. 180-198.
37. Mahmud Z. H., Wright A. C., Mandal S. C., Dai J., Jones M. K., Hasan M., Rashid M. H., Islam M. S., Johnson J. A., Gulig P. A., Ali A., Morris, J. G., 2010. Genetic characterization of Vibrio vulnificus strains from tilapia aquaculture in Bangladesh. Applied and Environmental Microbiology, V. 76, №. 14, p. 4890-4895.
38. Maxcy R. B., 1973. Condition of coliform organisms influencing recovery of subcultures on selective media. Journal of Milk and Food Technology, V. 36, №. 8, p. 414-416.
39. McDonald L. C., Hackney C. R., Ray B., 1983. Enhanced recovery of injured Escherichia coli by compounds that degrade hydrogen peroxide or block its formation. Applied and Environmental Microbiology, V. 45, №. 2, p. 360-365.
40. McLellan S. L., Daniels A. D., Salmore A. K., 2001. Clonal Populations of Thermotolerant Enterobacteriaceae in Recreational Water and Their Potential Interference with Fecal Escherichia coli Counts. Applied and Environmental Microbiology, V. 67, №. 10, p. 4934-4938.
41. Medrek T. F., Litsky W., 1960. Comparative incidence of coliform bacteria and enterococci in undisturbed soil. Applied Microbiology, V. 8, №. 1, p. 60-63.
42. Michaud L., Lo Giudice A., Troussellier M., Smedile F., Bruni V., Blancheton J. P., 2009. Phylogenetic characterization of the heterotrophic bacterial communities inhabiting a marine recirculating aquaculture system. Journal of Applied Microbiology, V. 107, №. 6, p. 1935-1946.
43. Mitchell J. C., McAvoy B. V., 1990. Enteric bacteria in natural populations of freshwater turtles in Virginia. Virginia Journal of Science, V. 41, №. 3, p. 233-242.
44. Moss C. W., Speck M. L., 1966 a. Identification of nutritional components in trypticase responsible for recovery of Escherichia coli injured by freezing. Journal of Bacteriology, V. 91, №. 3, p. 1098-1104.
45. Moss C. W., Speck M. L., 1966 b. Release of biologically active peptides from Escherichia coli at subzero temperatures. Journal of Bacteriology, V. 91, №. 3, p. 1105-1111.
46. Mossel D. A. A., Veldman A., Eelderink I., 1980. Comparison of the effects of liquid medium repair and the incorporation of catalase in MacConkey type media on the recovery of Enterobacteriaceae sublethally stressed by freezing. Journal of Applied Microbiology, V. 49, №. 3, p. 405-419.
47. Muela A., Seco C., Camafeita E., Arana I., Orruño M., López J. A., Barcina I., 2008. Changes in Escherichia coli outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. FEMS Microbiology Ecology, V. 64, №. 1, p. 28-36.
48. Oliver J.D., 2000. The Public Health Significance of Viable but Nonculturable Bacteria. Nonculturable microorganisms in the environment, ASM Press, Washington, DC, p. 277-300.
49. Park S. I., 1978. Numerical Changes of the Coliform Bacteria in a Recirculating Aquarium. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, V. 11, №. 1, p. 5-8.
50. Porter J., Edwards C., Pickup R. W., 1995. Rapid assessment of physiological status in Escherichia coli using fluorescent probes. Journal of Applied Microbiology, V. 79, №. 4, p. 399-408.
51. Pullela S., Fernandes C. F., Flick G. J., Libey G. S., Smith S. A., Coale C. W., 1998. Indicative and pathogenic microbiological quality of aquacultured finfish grown in different production systems. Journal of Food Protection, V. 61, N 2, p. 205-210.
52. Raghavan R. P., 2003. Incidence of human pathogenic bacteria in shrimp feeds-A study from India. NAGA, WorldFish Center Quarterly, V. 26, №. 2, p. 22-24.
53. Rahimi E., Shakerian A., Falavarjani A. G., 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from fish, shrimp, lobster, and crab in Iran. Comparative Clinical Pathology, V. 22, №. 1, p. 59-62.
54. Ray B., 1989. Injured Index and Pathogenic Bacteria: Occurence and Detection in Foods, Water and Feeds. CRC Press.
55. Ray B., Speck M. L., 1972. Repair of injury induced by freezing Escherichia coli as influenced by recovery medium. Applied Microbiology, V. 24, №. 2, p. 258-263.
56. Ray B., Speck M. L., 1973. Enumeration of Escherichia coli in frozen samples after recovery from injury. Applied Microbiology, V. 25, №. 4, p. 499-503.
57. Rose R. E., Geldreich E. E., Litsky W., 1975. Improved membrane filter method for fecal coliform analysis. Applied Microbiology, V. 29, №. 4, p. 532-536.
58. Sarkar B. L., Nai, G. B., Banerjee A. K., Pal S. C., 1985. Seasonal distribution of Vibrio parahaemolyticus in freshwater environs and in association with freshwater fishes in Calcutta. Applied and Environmental Microbiology, V. 49, №. 1, p. 132-136.
59. Sartory D. P., 1995. Improved recovery of chlorine-stressed coliforms with pyruvate supplemented media. Water Science and Technology, V. 31, №. 5-6, p. 255-258.
60. Scheible O.K., Casey M. C., Forndran A., 1985. Ultraviolet disinfection of wastewaters from secondary effluent and combined sewer overflows. EPA 600/2-86-05. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
61. Scheusner D. L., Busta F. F., Speck M. L, 1971. Inhibition of injured Escherichia coli by several selective agents. Applied Microbiology, V. 21, №. 1, p. 46-49.
62. Senderovich Y., Izhak, I., Halpern M., 2010. Fish as reservoirs and vectors of Vibrio cholerae. PLoS ONE, V. 5, №. 1, p. 8607.
63. Sharrer M.J., Summerfelt S.T., 2007. Ozonation followed by ultraviolet irradiation provides effective bacteria inactivation in a freshwater recirculating system. Aquacultural Engineering, V.37, p. 180–191.
64. Sidhu J. P., Toze S. G., 2009. Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. Environment International, V. 35, №. 1, p. 187-201.
65. Silk T. M., Ryser E. T., Donnelly C. W., 1997. Comparison of methods for determining coliform and Escherichia coli levels in apple cider. Journal of Food Protection, V. 60, №. 11, p. 1302-1305.
66. Sinskey T. J., Silverman G. J., 1970. Characterization of injury incurred by Escherichia coli upon freeze-drying. Journal of Bacteriology, V. 101, №. 2, p. 429-437.
67. Speck M. L., Warseck M., Ray B., 1973. Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods. Applied Microbiology, V. 26, №. 6, p. 919-924.
68. Speck M. L., Ray B., Read R. B., 1975. Repair and enumeration of injured coliforms by a plating procedure. Applied Microbiology, V. 29, №. 4, p. 549-550.
69. Straka R. P., Stokes J. L., 1959. Metabolic injury to bacteria at low temperatures. Journal of Bacteriology, V. 78, №. 2. p. 181.
70. Summerfelt S. T., 2003. Ozonation and UV irradiation—an introduction and examples of current applications. Aquacultural Engineering, V. 28, №. 1-2, p. 21-36.
71. Sunyer J. O., Tort L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream Sparus aurata serum are effected by the alternative complement pathway. Veterinary Immunology and Immunopathology, V. 45, №. 3-4, p. 333-345.
72. Tallon P., Magajna B., Lofranco C., Leung K. T., 2005. Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. Water, Air, and Soil Pollution, V. 166, №. 1-4, p. 139-166.
73. Toonen R. J., Wee C. B., 2005. An experimental comparison of sediment-based biological filtration designs for recirculating aquarium systems. Aquaculture, V. 250, №. 1-2, p. 244-255.
74. Tort L., 2011. Stress and immune modulation in fish. Developmental & Comparative Immunology, V. 35, №. 12, p. 1366-1375.
75. Trust T. J., Money V. G., 1972. Bacterial population of diets for aquarium fishes. Journal of the Fisheries Board of Canada, V. 29, №. 4, p. 429-433.
76. Trust T.J., Barlett K. H., 1974. Occurrence of potential pathogens in water containing ornamental fishes. Applied Microbiology, V. 28, №. 1, p.35-40.
77. Van Damme L. R., Vandepitte J., 1980. Frequent isolation of Edwardsiella tarda and Pleisiomonas shigelloides from healthy Zairese freshwater fish: a possible source of sporadic diarrhea in the tropics. Applied and Environmental Microbiology, V. 39, №. 3, p. 475-479.
78. Vazzana M., Cammarata M., Cooper E. L., Parrinello N., 2002. Confinement stress in sea bass (Dicentrarchus labrax) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. Aquaculture, V. 210, №. 1-4, p. 231-243.
79. Verburg‐Van Kemenade B. M. L., Stolte E. H., Metz J. R., Chadzinska M., 2009. Neuroendocrine–immune interactions in teleost fish. Fish physiology, V. 28, p. 313-364.
80. Virginia Aquarium Water Quality Parameters Explained, 2016
81. WHO, 2003. Assessing microbial safety of drinking water.
82. Westhoff D., Nedoluha P. C., 1993. Microbiological flora of aquacultured hybrid striped bass. Journal of Food Protection, V. 56, №. 12, p. 1054-1060.
83. Whitby G.E., Palmateer G., 1993. The effect of UV transmission, suspended solids and photoreactivation on microorganisms in wastewater treated with UV. Water Science and Technology, V. 27, p.379-386.
84. Zhang Y., Hong P. Y., LeChevallier M. W., Liu W. T., 2015. Phenotypic and Phylogenetic Identification of Coliform Bacteria Obtained Using 12 Coliform Methods Approved by the US Environmental Protection Agency. Applied and Environmental Microbiology, V. 81, №. 17, p. 6012-6023.
85. Zhang S., Ye C., Lin H., Lv L., Yu X., 2015. UV disinfection induces a VBNC state in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Environmental Science & Technology, V. 49, №. 3, p. 1721-1728.