



БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ПРОФИЛИ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ БИОМАРКЕРЫ ИЗОЛЯТОВ МИКРОБИОТЫ СРЕДЫ ОБИТАНИЯ: ФАКТОРЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ОПАСНОСТИ

Н.В. Дудчик¹, С.И Сычик¹, О.Е. Нежвинская¹, Н.Д. Коломиец²,
Е.В. Федоренко¹, Е.В. Дроздова¹, О.В. Тонко², О.А. Емельянова¹

¹Научно-практический центр гигиены, Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Академическая, 8
²Белорусская академия последиplomного образования, 220013, г. Минск, Республика Беларусь,
ул. П. Бровки, 3

Произведена оценка бактериальных профилей микробиоты технологического оборудования пищевых производств, объектов лечебно-профилактических учреждений и водных объектов в зонах рекреации, исследование фенотипических признаков изолятов условно-патогенных бактерий как факторов идентификации опасности в рамках концепции оценки риска.

Объектом исследования послужили штаммы родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* и *Serratia*, выделенные во время гигиенического мониторинга с 2013 по 2017 г.

Для взятия проб использовали методы смывов, прямого посева, мембранной фильтрации, инструментальный аспирационный метод. Микробный статус анализировали культуральными и биохимическими методами на питательных и дифференциально-диагностических средах с последующим подтверждением методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Фенотипические особенности изучали *in vitro* стандартными биохимическими и микробиологическими методами в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики.

Выявлены особенности микробных профилей условно-патогенной микробиоты разных объектов среды обитания. Наиболее многочисленными группами являются: в воздушной среде лечебных учреждений 1–4-го классов чистоты – стафилококки (44 %), в смывах с объектов производства и лечебно-профилактических учреждений – бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (64 и 69 % соответственно), в водных объектах – бактерии рода *Pseudomonas* (46 %); 60 (36 %) изолятов из изученных 167 проявляли модифицированные морфологические и тинкториальные признаки в отношении типичных для рода. Большинство изолятов обладали комплексом модифицированных или атипичных метаболических признаков, таких как гемолитическая и лецитиназная активность, выраженные факторы персистенции, способность образовывать биопленки. Наиболее потенциально агрессивны штаммы условно-патогенных бактерий, выделенные из смывов пищевых производств и лечебно-профилактических учреждений. Изоляты этих же родов, выделенные из водных объектов зон рекреации и воздушной среды лечебно-профилактических учреждений, демонстрировали менее выраженные фенотипические свойства, характеризующие потенциал патогенности. Полученные экспериментальные данные дают материал для изучения феномена модификации фенотипических свойств и использования на этапах выявления и составления профиля опасности и минимизации неопределенности в рамках концепции анализа микробиологического риска.

Ключевые слова: микроорганизмы, микробиота, микробный статус, загрязнение, биомаркеры, формирование биопленки, методы восстановления, анализ микробиологического риска.

© Дудчик Н.В., Сычик С.И., Нежвинская О.Е., Коломиец Н.Д., Федоренко Е.В., Дроздова Е.В., Тонко О.В., Емельянова О.А., 2020

Дудчик Наталья Владимировна – доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией микробиологии (e-mail: n_dudchik@mail.ru, n_dudchik@tut.by; тел.: +375 (17) 284-13-85; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5877-9307>).

Сычик Сергей Иванович – кандидат медицинских наук, доцент, директор (e-mail: rspch@rspch.by; тел.: +375 (17) 284-13-70; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5493-9799>).

Нежвинская Ольга Евгеньевна – младший научный сотрудник лаборатории микробиологии (e-mail: rscph@rscph.by; тел.: +375 (17) 284-13-85; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4456-5922>).

Коломиец Наталья Дмитриевна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии и микробиологии (e-mail: ndkolomiets@mail.ru; тел.: +375 (17) 265-33-41; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4837-5181>).

Федоренко Екатерина Валерьевна – кандидат медицинских наук, доцент, докторант, заместитель директора по сопровождению практического и санитарно-эпидемиологического надзора и работе с ЕЭК (e-mail: rscph@rscph.by; тел.: +375 (17) 284-13-70, +375 (17) 284-03-45; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1240-1234>).

Дроздова Елена Валентиновна – кандидат медицинских наук, доцент, докторант, заместитель директора по научной работе (e-mail: rscph@rscph.by; тел.: +375 (17) 284-13-70, +375 (17) 284-03-45; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3032-0895>).

Тонко Оксана Владимировна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры эпидемиологии и микробиологии (e-mail: oxana_tonko@tut.by; тел.: +375 (17) 265-33-41; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5877-9307>).

Емельянова Ольга Андреевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии (e-mail: rscph@rscph.by; тел.: +375 (17) 284-13-70, +375 (17) 284-03-45; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6853-3431>).

Современные медико-биологические технологии и лабораторные практики обеспечивают изучение свойств микроорганизмов как на фенотипическом, так и на генотипическом уровне, способствуя обеспечению гигиенической безопасности среды обитания человека в экологических, физиологических и популяционных аспектах. Использование прогностических биомаркеров как значимых инструментов обеспечивает понимание и изучение механизмов формирования патогенного потенциала штаммов с учетом антропогенной нагрузки на микробиоту объектов среды обитания. Такой подход обоснован положениями эффективной биомедицинской биотехнологии «омикс» (omics). В последние годы были предприняты инициативы научного сообщества, цель которых – создать основу для конструктивного обсуждения, понимания, интегрирования и использования данных omics в концепции микробиологического риска в пищевых и водных матрицах. Интеграция направлена на решение ряда задач при проведении оценки микробиологического риска: изучение фенотипической и генотипической вариабельности и изменчивости микроорганизмов, разнонаправленные взаимодействия с биотическими и абиотическими факторами среды, в том числе изменение совокупности биомаркеров, формирующих потенциал патогенности и вирулентности. Это обеспечивает наиболее полную идентификацию микробиологических опасностей, составление объективного профиля риска и минимизирует неопределенности при проведении анализа риска [1, 2].

Феномен оппортунистических и эмерджентных инфекций, который сформировался в самостоятельную медико-биологическую проблему, может быть объяснен модификацией фенотипических и генотипических признаков, в том числе этиологических и патогенетических свойств условно-патогенных микроорганизмов под воздействием качественно и количественно изменяющихся антропогенных факторов [3, 4]. Пищевые продукты, технологические процессы их производства, водные рекреационные объекты, среда лечебно-профилактических учреждений представляются как качественно новые экологические ниши, сформировавшиеся в условиях развитого индустриального производства и значительных антропогенных нагрузок. Указанное формирует необходимость углубленного изучения свойств микробиоты отдельных элементов среды обитания человека, особенно в условиях широкого и систематического применения модифицирующих факторов (дезинфектантов, консервантов, физических факторов) для разработки эффективных мер по управлению микробиологическим рисками.

Цель работы – экспериментальное установление бактериальных профилей изолятов условно-патогенной микробиоты отдельных элементов среды обитания человека, изучение физиолого-биохимических, тинкториальных, морфологических биомаркеров потенциала патогенности с целью их дальнейшего ис-

пользования при формировании профиля микробиологического риска.

Материалы и методы. Метод выявления микроорганизмов на поверхностях технологического оборудования пищевых производств и с объектов лечебно-профилактических учреждений. Использовали метод смывов как наиболее широко признанный и используемый в полевых условиях. Взятие смывов производили с помощью стерильных увлажненных ватных тампонов. Репрезентативной считали пробу, снятую с поверхности 10×10 см (площадь 100 см²).

Метод выявления микроорганизмов из поверхностных водных объектов, используемых в рекреационных целях. Использовали методы прямого посева и мембранной фильтрации водных проб.

Метод выявления микроорганизмов из воздушной среды помещений лечебно-профилактических учреждений разных классов чистоты. Отбор проб воздуха объемом 100–500 дм³ проводили инструментальным аспирационным методом на контактные чашки Петри с питательной или дифференциально-диагностической средами.

Микробный статус отобранных проб анализировали культуральными методами на питательных и дифференциально-диагностических средах, проводя инкубацию при оптимальных для выявляемого микроорганизма условиях. Учитывали все сформированные колонии на поверхности и в толще агара.

Идентификацию до вида чистых культур проводили с использованием микробиологического анализатора VITEK (*Biomérieux*) после окраски по Граму с последующей верификацией методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на принципах GLP.

Оценку гемолитической, лецитиназной активности и способности к персистенции проводили на чистой суточной культуре, после культивирования на питательном агаре в течение 18–24 ч при оптимальной температуре в соответствии с методикой [5, 6]. Способность к пленкообразованию изучали оптическим методом при культивировании на планшетах и детекцией при $\lambda = 540$ нм с интерпретацией результатов по критерию *Stepanovic* [6].

В работе использовали средства измерений и испытательное оборудование, должным образом поверенное и калиброванное.

Результаты и их обсуждение. Изучены бактериальные профили объектов пищевых производств и лечебно-профилактических учреждений, воздушной среды лечебно-профилактических учреждений, водных объектов в зонах рекреации.

Необходимо отметить, что обоснованный выбор методов выявления бактериальных штаммов из объектов среды обитания и изучения их фенотипических признаков является критическим в проведении репрезентативного микробиологического мониторинга. Приемлемость таких методов основана на оценке типа, природы и микробной контаминации объектов мониторинга [7].

Микробиота играет важную роль как в поддержании экологического равновесия, так и в обеспечении гигиенической безопасности объектов среды обитания человека, поэтому определение профиля бактериального сообщества может дать дополнительную информацию о потенциальном риске [8, 9].

В исследовании определен бактериальный профиль и изучены фенотипические свойства представителей микробиоты зон рекреации трех водохранилищ Минского района в весенне-летний период. В этот период выделены и изучены более 100 бактериальных изолятов, при этом основная их часть проявляла свойства психрофильных или мезофильных сапрофитных бактерий (69 %), а структура микробного сообщества в значительной степени зависела от температурного режима. Наши данные соответствуют выводам ряда работ по изучению микробиома пресных источников [10, 11]. В работе S.L. Chang et al. [10] авторы отмечают в водных объектах наличие бактерий родов *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fingoldia*, *Burkholderia*, *Clostridia*, *Bacilli* и *Klebsiella*, а в работе T. Gorham et al. [11] – достаточно высокий уровень контаминации индикатором фекального загрязнения *Escherichia coli*.

Микробный статус воздушной среды и объектов лечебно-профилактических учреждений изучен в ходе гигиенического мониторинга помещений 1–4-го классов чистоты лечебно-профилактических учреждений г. Минска в течение 2016–2018 гг. Среди 250 изолированных штаммов более 70 % составляли психротрофные сапрофитные, менее значительную часть – мезофильные условно-патогенные бактерии, что подтверждается результатами ряда исследований [12–14]. В работах S. Lax et al. и F. Bolookat et al. [12, 13] приведены данные о частых случаях выявления в воздухе лечебно-профилактических учреждений бактерий родов *Corynebacterium*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* и менее значительной части – родов *Acinetobacter* и *Pseudomonas*, *Micrococcus* и *Prevotella*, ассоциированных с нормальной микробиотой кожных покровов и слизистых человека. В работе S. Fujiyoshi et al. [14] также приводятся данные метаанализа микробиоты лечебных учреждений. С нормальной микробиотой человека ассоциированы роды *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Lactococcus*, а с открытой воздушной средой – *Streptophyta*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Sphingomonas*.

Микробиота пищевых предприятий изучалась на трех предприятиях пищевой промышленности в ходе гигиенического мониторинга в 2013–2015 гг. В ряде работ сообщалось, что представители бактериальной микробиоты могут не только выживать, но и увеличивать численность популяции на широком спектре поверхностей, таких как пластик, нержавеющая сталь, стекло, керамика и дерево. Это может приводить к перекрестной контаминации между готовым пищевым продуктом, продовольственным

сырьем и персоналом. По мнению ряда авторов, динамический контроль микробной контаминации является одним из инструментов для гигиенического контроля условий производства пищевой продукции и снижения рисков контаминации [15–18].

Бактерии родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* и *Serratia* являются широко распространенными микробными контаминантами, составляя часть микробиоты пищевых производств, лечебно-профилактических учреждений и водных рекреационных объектов, представляя ареал эмерджентных и оппортунистических инфекций с пищевым, водным и воздушным путями передачи. В ходе работы были изолированы, идентифицированы и изучены 167 бактериальных штаммов условно-патогенных микроорганизмов. С поверхностей технологического оборудования пищевых производств изолировано 59 изолятов, с объектов лечебно-профилактических учреждений – 35, из воздушной среды помещений лечебно-профилактических учреждений разных классов чистоты – 34, из поверхностных водных объектов, используемых в рекреационных целях, – 39.

Кроме бактериальных изолятов, отмечено более 90 случаев контаминации образцов дрожжевыми грибами рода *Candida*, плесневыми грибами родов *Penicillium* и *Aspergillus*, в одной из водных проб выявлена патогенная бактерия рода *Legionella*, патогенные бактерии родов *Salmonella* и *Listeria* не обнаружены в смывах пищевых производств (данные не приведены).

Экспериментальные данные представлены в таблице.

Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* встречались наиболее часто в смывах с объектов пищевых производств и лечебно-профилактических учреждений, составляя 64 и 69 % от всего числа условно-патогенных бактерий соответственно. В воздушной среде лечебно-профилактических учреждений этот показатель составлял 24 %, в водных объектах – 33 %. Стафилококки являлись преобладающим родом среди условно-патогенных микроорганизмов воздушной среды лечебно-профилактических учреждений (44 %). В водных объектах наиболее многочисленны были бактерии рода *Pseudomonas* (46 %).

В нашей работе 60 изолятов условно-патогенных бактерий из изученных 167 (36 %) проявляли морфологические и тинкториальные признаки, модифицированные в отношении типичных для рода, в том числе варибельность окраски по Граму, внутрипопуляционный полиморфизм клеток, который выражался в размерах, форме клеток и колоний и др.

В ряде исследований отмечено, что вирулентность и патогенность микробных контаминантов усиливаются экзогенной секрецией ряда ферментов и токсинов, продуцируемыми бактериями [19–21]. В нашей работе выявлено, что изоляты условно-патогенных бактерий среды лечебно-профилактических учреждений, пищевых производств и водных

Фенотипические признаки бактериальных изолятов, выделенных из смывов объектов пищевых производств, объектов и воздушной среды лечебно-профилактических учреждений, водных объектов

Род	Фенотипический признак					
	гемолиз	антилиз- цимная активность	антиинтер- фероновая активность	лецитиназная активность	пленкооб- разование	морфологические и тинкториальные признаки
<i>Смывы объектов пищевых производств</i>						
<i>Escherichia</i> (18 изолятов)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Вариабельные
<i>Klebsiella</i> (6 изолятов)	γ	+/-	+/-	+/-	max	Вариабельные
<i>Serratia</i> (6 изолятов)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Вариабельные
<i>Enterobacter</i> (5 изолятов)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Вариабельные
<i>Citrobacter</i> (3 изолята)	γ	+/-	+/-	+/-	+/-	Вариабельные
<i>Staphylococcus</i> (11 изолятов)	α/β	+/-	+/-	+/-	min	Вариабельные / стабильные
<i>Pseudomonas</i> (10 изолятов)	α/β	+/-	+/-	+/-	+	Вариабельные / стабильные
<i>Смывы с объектов лечебно-профилактических учреждений</i>						
<i>Escherichia</i> (9 изолятов)	γ	+/-	+/-	+/-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Klebsiella</i> (4 изолята)	γ	+/-	+/-	+/-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Serratia</i> (3 изолята)	γ	+/-	+/-	+/-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Enterobacter</i> (4 изолята)	γ	+/-	+/-	+/-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Citrobacter</i> (4 изолята)	γ	+/-	+/-	+/-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Staphylococcus</i> (6 изолятов)	α/β	+/-	+/-	+/-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Pseudomonas</i> (5 изолятов)	α	+/-	+/-	+/-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Пробы воздушной среды лечебно-профилактических учреждений</i>						
<i>Escherichia</i> (3 изолята)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Стабильные
<i>Klebsiella</i> (один изолят)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Стабильные
<i>Serratia</i> (один изолят)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Enterobacter</i> (один изолят)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Citrobacter</i> (2 изолята)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Стабильные
<i>Staphylococcus</i> (15 изолятов)	α/β	+/-	+/-	+/-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Pseudomonas</i> (12 изолятов)	α	+/-	+/-	+/-	+/-	Стабильные
<i>Пробы водных объектов в зонах рекреации</i>						
<i>Escherichia</i> (6 изолятов)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Klebsiella</i> (2 изолята)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Serratia</i> (один изолят)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Enterobacter</i> (2 изолята)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Citrobacter</i> (2 изолята)	γ	+/-	+/-	-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Staphylococcus</i> (8 изолятов)	α/β	+/-	+/-	+/-	+/-	Вариабельные / стабильные
<i>Pseudomonas</i> (18 изолятов)	α	+/-	+/-	+/-	max	Вариабельные / стабильные

рекреационных объектов проявляли атипичные или модифицированные свойства, такие как гемолитическая и лецитиназная активность, сильные факторы персистенции, способность образовывать биопленки.

β-гемолитическая активность выявлена для всех изученных изолятов *S. aureus*, из воздушной среды выделен ряд изолятов *Staphylococcus spp.*, с неполной гемолитической активностью; α-гемолитическая активность продемонстрирована изоля-

тами *P. aeruginosa*, выявленными из водных объектов и смывов с технологического оборудования, а некоторые изоляты рода *Pseudomonas* проявили способность к полному гемолизу, в том числе при повышенной температуре, что может указывать на продуцирование гемолизина двух типов – термолабильной фосфолипазы С и термостабильного гликолипида. Изоляты семейства *Enterobacteriaceae* демонстрировали γ -гемолитическую активность.

100 % изученных штаммов *Staphylococcus aureus* проявляли лецитиназную активность. Антиинтерфероновая и антилизосимная активности как факторы персистенции направлены на инактивацию механизмов защиты хозяина. Эти фенотипические признаки наиболее полно проявлялись для изолятов рода *Staphylococcus*, при этом природа объекта, из которой были выделены изоляты, существенным образом не влияла на выраженность комплекса признаков персистенции. Из 39 штаммов *Staphylococcus* 15 проявили антилизосимную активность при концентрации лизоцима 4 мг/мл или менее, 23 штамма – антиинтерфероновую активность при концентрации интерферона 2 усл.ед./мл, остальные штаммы – при концентрации 1 усл.ед./мл. Этот феномен коррелирует с хорошим ростом штаммов *Staphylococci* на питательном агаре с фузидином при концентрации фузидина 0,00015–0,0003 мг/мл.

Бактерии рода *Pseudomonas* продуцировали пигменты групп пиоцианина и пиовердина, в то время как пигментообразование группы пиомеланина отмечено лишь для нескольких изолятов, при этом интенсивность пигментообразования была весьма различна. Выделены 5 штаммов, продуцирующих одновременно два пигмента, большинство изолятов продуцируют пигменты одной группы, выделен также беспигментный изолят. В настоящее время мутации, приводящие к уменьшению способности к продукции пигментов, рассматриваются рядом исследователей как механизмы повышения патогенного потенциала этой бактерии, в частности, при полимикробной инфекции.

Однако самой совершенной и сложной стратегией защиты бактерий в ответ на воздействие факторов окружающей среды является образование биопленок. Изученные штаммы имели различную способность к образованию биопленок в монокультуре. Все штаммы *Klebsiella pneumoniae* проявили высокую степень способности к пленкообразованию в соответствии с критерием *Stepanovic*. Коагулазонегативные стафилококки (*S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. epidermidis*) проявляли минимальную активность в отношении пленкообразования. Коагулазопозитивные стафилококки были более активны в отношении образования биопленок в модельном эксперименте, что подкрепляется недавними исследованиями о том, что гемолизин участвует в формировании био-

пленки *S. aureus* [21]. Способность бактерий образовывать биопленки интересна ввиду того, что многие микроорганизмы могут менять свои характеристики, а консорциум микроорганизмов в виде биопленки – приобретать новые свойства, не свойственные составляющим его штаммам. По мнению ряда авторов, межвидовые коммуникации у бактерий могут служить для синхронизации специализированных функций видов в группе. Фенотипические признаки штаммов в биопленке в значительной степени отличаются от типичных признаков рода и вида микроорганизма. Это относится к параметрам метаболической активности, способности продуцировать экзогенные ферменты, устойчивости / чувствительности к антибиотикам, сульфаниламидным препаратам, дезинфицирующим средствам, устойчивости к воздействию неблагоприятных физических факторов внешней среды (температура, pH, осмолярность, излучение), наличию эпидемически значимых маркеров и т.д.

Современным и весьма эффективным подходом дальнейшего развития методологии оценки микробиологического риска является использование принципов «омикс», в том числе направленных на изучение фенотипической вариативности для минимизации неопределенности при проведении анализа риска. Авторы такого подхода уверены, что технологии «омикс» обеспечивают использование биомаркеров как инструментов для понимания значимости динамики фенотипических параметров микроорганизмов для формирования патогенеза штаммов. Некоторые патогены существуют в форме квазивидов, являющихся флуктуирующими популяциями генетически разнородных вариантов, существующих в одном объекте [1, 2].

Популяция, сообщество и экосистема представляют динамические уровни, характеризующие микробиоту различных объектов среды обитания человека. Микробные патогены проявляют комплекс взаимодействий с представителями своего вида, других видов и абиотической среды обитания. Так, представители микробиоты конкурируют за ресурсы, приводя к усилению факторов патогенности и вирулентности у условно-патогенных микроорганизмов, что может значительно усложнять экологическую динамику их распространения и распределения.

Изоляты условно-патогенных микроорганизмов с модифицированными фенотипическими свойствами, выделенные из объектов среды обитания, могут являться эффективными тест-моделями для выявления и количественной оценки антимикробных воздействий и гигиенической регламентации факторов среды химической, физической или биологической природы, так как демонстрируют высокую специфичность и чувствительность в модельном эксперименте. В исследовании выявлены зависимости между чувствительностью микроор-

организмов к неблагоприятным химическим воздействиям и их способностью к пленкообразованию. По нашему мнению, дальнейшее развитие этого направления исследований может лежать в области оценки биологического действия факторов среды обитания химической, физической, биологической и комплексной природы [22].

Выводы:

1. Микробный профиль условно-патогенной микробиоты различен для разных объектов среды обитания человека. Так, наиболее многочисленными группами являются: в воздушной среде лечебных учреждений 1–4-го классов чистоты стафилококки (44 %), в смывах с объектов производства и лечебно-профилактических учреждений – бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (64 и 69 % от всего числа условно-патогенных бактерий соответственно), в водных объектах – бактерии рода *Pseudomonas* (46 %).

2. В данном исследовании 60 изолятов условно-патогенных бактерий из изученных 167 (36 %) проявляли модифицированные в отношении типичных для рода морфологические и тинкториальные признаки, в том числе вариабельность окраски по Граму, полиморфизм клеток и др. Большинство изолятов среды лечебно-профилактических учреждений, пищевых производств и водных рекреационных объектов обладали комплексом модифицированных признаков потенциала патогенности, таких как гемолитическая и лецитиназная активность, выраженные факторы персистенции, способность образовывать биопленки. Различия показателей потенциала патогенности условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из различных объектов среды обитания, могут быть обусловлены количественными параметрами составляющих его биомаркеров в зависимости от множественности и сложности взаимодействия антропогенных факторов отбора в среде.

3. Проведенный анализ показал, что наиболее потенциально агрессивны штаммы условно-патогенных бактерий, выделенные из смывов пищевых производств и лечебно-профилактических медицинских учреждений. Изоляты этих же родов, выделенные из водных объектов зон рекреации и воздушной среды лечебно-профилактических учреждений, демонстрировали менее выраженные фенотипические свойства, характеризующие потенциал патогенности.

Феномен модификации фенотипических свойств микроорганизмов под действием антропо-

генных факторов среды отмечен в ряде работ, однако сравнение признаков изолятов условно-патогенных бактерий, выделенных из различных объектов среды обитания человека, ранее не проводилось. Представленные в работе экспериментальные данные дают материал для изучения и анализа этого феномена, что весьма важно учитывать на этапах выявления и составления профиля опасности и минимизации неопределенности в рамках концепции анализа микробиологического риска. Выявлены особенности микробных профилей и комплекса фенотипических признаков представителей условно-патогенной микробиоты объектов среды обитания. Показано, что 60 изолятов (36 %) из изученных 167 проявляли модифицированные гемолитическую и лецитиназную активности, выраженные факторы персистенции, способность образовывать биопленки. Структура микробиоты изученных объектов различалась: в воздушной среде лечебных учреждений наиболее многочисленными были стафилококки (44 %), в смывах с объектов производства и лечебно-профилактических учреждений – бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (64 и 69 % соответственно), в водных объектах – бактерии рода *Pseudomonas* (46 %). Потенциал агрессивных штаммов условно-патогенных бактерий из смывов пищевых производств и лечебно-профилактических учреждений был наиболее выражен. Дальнейшее изучение феномена модификации фенотипических признаков микробиоты среды обитания человека может уточнить и расширить список оппортунистических и эмергентных условно-патогенных бактерий, научно обосновать разработку наиболее эффективных мер по управлению микробиологическими рисками, ассоциированными с различными факторами среды обитания. Кроме того, штаммы микроорганизмов с выраженным потенциалом агрессии представляют собой эффективные и релевантные тест-модели для выявления и количественной оценки антимикробных воздействий, создавая аггравированные условия высокой микробной нагрузки в модельном эксперименте.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Next generation of microbiological risk assessment: Potential of omics data for exposure assessment / H.M.W. Den Besten, A. Amézquita, S. Bover-Cid, S. Dagnas, M. Ellouze, S. Guillou, G. Nychas, C. O'Mahony [et al.] // Int. J. of Food Microbiol. – 2018. – Vol. 20, № 287. – P. 18–27. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.006
2. Next generation of microbiological risk assessment: Potential of omics data for hazard characterization / N. Haddad, N. Johnson, S. Kathariou, A. Métris, T. Phister, A. Pielaat, C. Tassou [et al.] // Int. J. of Food Microbiol. – 2018. – Vol. 20, № 287. – P. 28–39. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.015
3. Vouga M., Greub G. Emerging bacterial pathogens: the past and beyond // Clin. Microbiol. Infect. – 2016. – Vol. 22, № 1. – P. 12–21. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.10.010

4. Fournier P.E., Drancourt M., Raoult D. New laboratory tools for emerging bacterial challenges // *Clin. Infect. Dis.* – 2017. – Vol. 15, № 65 (1). – P. S39–S49. DOI: 10.1093/cid/cix405
5. Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М.: Мир, 1984. – Т. 3. – 536 с.
6. Методы оценки эпидемиологической значимости условно патогенной микрофлоры / О.Е. Нежвинская, Н.В. Дудчик, Н.Д. Коломиец, О.В. Тонко, Е.В. Дроздова // *Здоровье и окружающая среда: сборник научных трудов* / под ред. С.И. Сычика. – Минск: РНМБ, 2015. – Т. 1, № 25. – С. 69–71.
7. Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature / R. Ismail, F. Aviat, V. Michel, I. Le Bayon, P. Gay-Perret, M. Kutnik, M. Fédérighi // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2013. – Vol. 10, № 11. – P. 6169–6183. DOI: 10.3390/ijerph10116169
8. Fungal and Bacterial Communities in Indoor Dust Follow Different Environmental Determinants / F. Weigl, C. Tischer, A.J. Probst, J. Heinrich, I. Markevych, S. Jochner, K. Pritsch // *PLoS One.* – 2016. – Vol. 21, № 11 (4). – P. e0154131. DOI: 10.1371/journal.pone.0154131
9. Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river / L. Wang, J. Zhang, H. Li, H. Yang, C. Peng, Z. Peng, L. Lu // *Science of The Total Environ.* – 2018. – Vol. 15, № 627. – P. 600–612. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.203
10. The microbiota of recreational freshwaters and the implications for environmental and public health / C.S. Lee, M. Kim, C. Lee, Z. Yu, J. Lee // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 1826. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01826
11. Gorham T., Lee J. Pathogen loading from Canada geese faeces in freshwater: potential risks to human health through recreational water exposure // *Zoonoses Public Health.* – 2016. – Vol. 63, № 3. – P. 177–190. DOI: 10.1111/zph.12227
12. Colonization and succession of hospital-associated microbiota / S. Lax, D. Smith, N. Sangwan, K. Handley, P. Larsen, M. Richardson, S. Taylor, E. Landon [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2017. – Vol. 9, № 391. – P. eaah6500. DOI: 10.1126/scitranslmed.aah6500
13. Assessment of bioaerosol particle characteristics at different hospital wards and operating theaters: A case study in Tehran / F. Bolookat, M.S. Hassanvand, S. Faridi, M. Hadei, M. Rahmatinia, M. Alimohammadi // *MethodsX.* – 2018. – Vol. 5. – P. 1588–1596. DOI: 10.1016/j.mex.2018.11.021
14. Fujiyoshi S., Tanaka D., Maruyama F. Transmission of airborne bacteria across built environments and its measurement standards: a review // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 2336. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02336
15. Detection of alpha-toxin and other virulence factors in biofilms of *Staphylococcus aureus* on polystyrene and a human epidermal model / P.M. Den Reijer, E.M. Haisma, N.A. Lemmens-den Toom, J. Willemse, R.I. Koning, J.A. Demmers, D.H. Dekkers, E. Rijkers [et al.] // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11. – P. e0145722. DOI: 10.1371/journal.pone.0145722
16. Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* strains with an incomplete hemolytic phenotype / H. Zhang, Y. Zheng, H. Gao, P. Xu, M. Wang, A. Li, M. Miao, X. Xie [et al.] // *Front. Cell Infect. Microbiol.* – 2016. – Vol. 6. – P. 146. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00146
17. A new perspective on microbial landscapes within food production / N.A. Bokulich, Z.T. Lewis, K. Boundy-Mills, D.A. Mills // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2016. – Vol. 37. – P. 182–189. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.12.008
18. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during chinese liquor fermentation / X. Wang, H. Du, Y. Zhang, Y. Xu // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2018. – Vol. 84, № 4. – P. e02369–e02417. DOI: 10.1128/AEM.02369-17
19. Карташова О.Л., Уткина Т.М. Регуляция персистентных свойств микроорганизмов факторами различной природы (обзор) // *Бюллетень Оренбургского науч. центра УрО РАН.* – 2013. – С. 1–11.
20. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment / A. Brauner, O. Fridman, O. Gefen, N.Q. Balaban // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2016. – Vol. 14. – P. 320–330.
21. Human pathogens in plant biofilms: formation, physiology, and detection / E. Ximenes, L. Hoagland, S. Ku, X. Li, M. Ladisch // *Biotechnol. Bioeng.* – 2017. – Vol. 114, № 7. – P. 1403–1418. DOI: 10.1002/bit.26247
22. Дудчик Н.В. Изучение свойств консорциума почвенных микроорганизмов как тест-объектов для оценки интегральной токсичности // *Гигиена и санитария.* – 2012. – Т. 91, № 5. – С. 82–84.

Бактериальные профили и фенотипические биомаркеры изолятов микробиоты среды обитания: факторы идентификации опасности / Н.В. Дудчик, С.И. Сычик, О.Е. Нежвинская, Н.Д. Коломиец, Е.В. Федоренко, Е.В. Дроздова, О.В. Тонко, О.А. Емельянова // Анализ риска здоровью. – 2020. – № 2. – С. 92–100. DOI: 10.21668/health.risk/2020.2.10

UDC 613.2+614.31+613.636
DOI: 10.21668/health.risk/2020.2.10.eng

Read
online



BACTERIAL PROFILES AND PHENOTYPIC BIOMARKERS OF MICROBIOTA ISOLATES IN HABITAT: HAZARD IDENTIFICATION FACTORS

N.V. Dudchik¹, S.I. Sychik¹, O.E. Nezhvinskaya¹, N.D. Kolomiets², E.V. Fedorenko¹,
E.V. Drozdova¹, O.V. Tonko², O.A. Emel'yanova¹

¹Scientific Practical Centre of Hygiene, 8 Akademicheskaya Str., Minsk, 220012, Belarus

²Belarus Medical Academy for Post-graduate Studies, 3/3 P. Brovki Str., Minsk, 220013, Belarus

The present work focuses on assessing bacterial profiles of microbiota existing on technological equipment applied in food products manufacturing, objects located inside medical and preventive facilities, and water objects in recreation zones; another goal was to examine phenotypic properties of opportunistic pathogenic bacteria isolates as hazard identification factors within the framework of risk assessment concept.

Our research objects were strains of Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Staphylococcus, Pseudomonas, Citrobacter and Serratia families that were detected and extracted due to hygienic monitoring activities performed in 2013–2017.

Samples were taken via washing, direct inoculation, membrane filtration, and instrumental aspiration technique. Microbial status was analyzed with cultural and biochemical techniques on nutrient and differential-diagnostic media with subsequent confirmation with polymerase chain reaction (PCR). Phenotypic peculiarities were examined in vitro with conventional biochemical and microbiological techniques in conformity with the requirement fixed in Good Laboratory Practice.

We revealed peculiarities of microbial profiles belonging to opportunistic pathogenic microbiota on different objects in habitats. The greatest groups included staphylococci detected in the air inside medical organizations with 1–4 cleanness degree (44 %); Enterobacteriaceae family bacteria, in washes off objects located in manufacturing and medical and prevention facilities (64 % and 69 % accordingly); Pseudomonas family bacteria, in water objects (46 %). 60 (36 %) isolates out of 167 examined ones had modified morphological and tinctorial signs regarding those typical for a family. Most isolates had a set of modified or atypical metabolomic signs such as hemolytic and lecithinase activities, apparent persistent factors, and ability to create biofilms. Opportunistic pathogenic bacteria strains extracted from washes off objects located inside food products manufacturing and medical and preventive facilities were the most potentially aggressive. Isolates from the same families extracted from water objects in recreation zones and air inside medical and preventive facilities had less apparent phenotypic properties that characterized their pathogenic potential. Our experimental data provide useful materials for examining a phenomenon related to changes in phenotypic properties; they can be applied during revealing and drawing up a hazard profile and for minimizing uncertainty within the concept of microbiological risk analysis.

Key words: microorganisms, microbiota, microbial status, contamination, biomarkers, biofilms creation, recovery techniques, microbiologic risk analysis.

© Dudchik N.V., Sychik S.I., Nezhvinskaya O.E., Kolomiets N.D., Fedorenko E.V., Drozdova E.V., Tonko O.V., Emel'yanova O.A., 2020

Natal'ya V. Dudchik – Doctor of Biological Sciences, Associate Professor, Head of Microbiology Laboratory (e-mail: n_dudchik@mail.ru, n_dudchik@tut.by; tel.: +375 (17) 284-13-85; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5877-9307>).

Sergei I. Sychik – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Director (e-mail: rspch@rspch.by; tel.: +375 (17) 284-13-70; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5493-9799>).

Ol'ga E. Nezhvinskaya – Junior researcher at the Laboratory of Microbiology (e-mail: rscph@rscph.by; tel.: +375 (17) 284-13-85; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4456-5922>).

Natal'ya D. Kolomiets – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department for Epidemiology and Microbiology (e-mail: ndkolomiets@mail.ru; tel.: +375 (17) 265-33-41; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4837-5181>).

Ekaterina V. Fedorenko – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, doctoral candidate, Deputy Director responsible for support of practical sanitary-epidemiologic surveillance and work with the Eurasian Economic Commission (e-mail: rscph@rscph.by; tel.: +375 (17) 284-13-70; +375 (17) 284-03-45; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1240-1234>).

Elena V. Drozdova – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, doctoral candidate, Deputy Director responsible for research (e-mail: rscph@rscph.by; tel.: +375 (17) 284-13-70, +375 (17) 284-03-45; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3032-0895>).

Oksana V. Tonko – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor at the Department for Epidemiology and Microbiology (e-mail: oxana_tonko@tut.by; tel.: +375 (17) 265-33-41; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5877-9307>).

Ol'ga A. Emel'yanova – Candidate of Biological Sciences, Senior researcher at the Laboratory of Microbiology (e-mail: rscph@rscph.by; tel.: +375 (17) 284-13-70, +375 (17) 284-03-45; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6853-3431>).

References

1. Den Besten H.M.W., Amézquita A., Bover-Cid S., Dagnas S., Ellouze M., Guillou S., Nychas G., O'Mahony C. [et al.]. Next generation of microbiological risk assessment: Potential of omics data for exposure assessment. *Int. J. of Food Microbiol*, 2018, vol. 20, no. 287, pp. 18–27. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.006
2. Haddad N., Johnson N., Kathariou S., Métris A., Phister T., Pielaat A., Tassou C. [et al.]. Next generation of microbiological risk assessment: Potential of omics data for hazard characterization. *Int. J. of Food Microbiol*, 2018, vol. 20, no. 287, pp. 28–39. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.015
3. Vouga M., Greub G. Emerging bacterial pathogens: the past and beyond. *Clin. Microbiol. Infect*, 2016, vol. 22, no. 1, pp. 12–21. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.10.010
4. Fournier P.E., Drancourt M., Raoult D. New laboratory tools for emerging bacterial challenges. *Clin. Infect. Dis.*, 2017, vol. 15, no. 65 (1), pp. S39–S49. DOI: 10.1093/cid/cix405
5. Metody obshchei bakteriologii [General bacteriology techniques]. In: F. Gerhardt [et al.] eds. Moscow, Mir Publ., 1984, vol. 3, 536 p. (in Russian).
6. Nezhvinskaya O.E., Dudchik N.V., Kolomiets N.D., Tonko O.V., Drozdova E.V. Metody otsenki epidemiologicheskoi znachimosti uslovnopatogennoi mikroflory [Techniques for assessing epidemiologic significance of opportunistic pathogenic microflora]. *Zdorov'e i okruzhayushchaya sreda: sbornik nauchnykh trudov*. In: S.I. Sychik ed. Minsk, RNMB Publ., 2015, vol. 1, no. 25, pp. 69–71 (in Russian).
7. Ismail R., Aviat F., Michel V., Le Bayon I., Gay-Perret P., Kutnik M., Fédérighi M. Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: a review of the literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2013, vol. 10, no. 11, pp. 6169–6183. DOI: 10.3390/ijerph10116169
8. Weigl F., Tischer C., Probst A.J., Heinrich J., Markeyvych I., Joehner S., Pritsch K. Fungal and Bacterial Communities in Indoor Dust Follow Different Environmental Determinants. *PLoS One*, 2016, vol. 21, no. 11 (4), pp. e0154131. DOI: 10.1371/journal.pone.0154131
9. Wang L., Zhang J., Li H., Yang H., Peng C., Peng Z., Lu L. Shift in the microbial community composition of surface water and sediment along an urban river. *Science of The Total Environ*, 2018, vol. 15, no. 627, pp. 600–612. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.01.203
10. Lee C.S., Kim M., Lee C., Yu Z., Lee J. The microbiota of recreational freshwaters and the implications for environmental and public health. *Front. Microbiol*, 2016, vol. 7, pp. 1826. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01826
11. Gorham T., Lee J. Pathogen loading from Canada geese faeces in freshwater: potential risks to human health through recreational water exposure. *Zoonoses Public Health*, 2016, vol. 63, no. 3, pp. 177–190. DOI: 10.1111/zph.12227
12. Lax S., Smith D., Sangwan N., Handley K., Larsen P., Richardson M., Taylor S., Landon E. [et al.]. Colonization and succession of hospital-associated microbiota. *Sci. Transl. Med*, 2017, vol. 9, no. 391, pp. eaah6500. DOI: 10.1126/scitranslmed.aah6500
13. Bolookat F., Hassanvand M.S., Faridi S., Hadei M., Rahmatinia M., Alimohammadi M. Assessment of bioaerosol particle characteristics at different hospital wards and operating theaters: A case study in Tehran. *Methods X*, 2018, vol. 5, pp. 1588–1596. DOI: 10.1016/j.mex.2018.11.021
14. Fujiyoshi S., Tanaka D., Maruyama F. Transmission of airborne bacteria across built environments and its measurement standards: a review. *Front. Microbiol*, 2017, vol. 8, pp. 2336. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02336
15. Den Reijer P.M., Haisma E.M., Lemmens-den Toom N.A., Willemse J., Koning R.I., Demmers J.A., Dekkers D.H., Rijkers E. [et al.]. Detection of alpha-toxin and other virulence factors in biofilms of *Staphylococcus aureus* on polystyrene and a human epidermal model. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, pp. e0145722. DOI: 10.1371/journal.pone.0145722
16. Zhang H., Zheng Y., Gao H., Xu P., Wang M., Li A., Miao M., Xie X. [et al.]. Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* strains with an incomplete hemolytic phenotype. *Front. Cell Infect. Microbiol*, 2016, vol. 6, pp. 146. DOI: 10.3389/fcimb.2016.00146
17. Bokulich N.A., Lewis Z.T., Boundy-Mills K., Mills D.A. A new perspective on microbial landscapes within food production. *Curr. Opin. Biotechnol*, 2016, vol. 37, pp. 182–189. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.12.008
18. Wang X., Du H., Zhang Y., Xu Y. Environmental microbiota drives microbial succession and metabolic profiles during chinese liquor fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*, 2018, vol. 84, no. 4, pp. e02369–e02417. DOI: 10.1128/AEM.02369-17
19. Kartashova O.L., Utkina T.M. Regulyatsiya persistentnykh svoistv mikroorganizmov faktorami razlichnoi prirody (obzor) [Persistent properties of microorganisms: regulation by different factors (review)]. *Byulleten' Orenburgskogo nauch. tsentra UrO RAN*, 2013, pp. 1–11 (in Russian).
20. Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban N.Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol*, 2016, vol. 14, pp. 320–330.
21. Ximenes E., Hoagland L., Ku S., Li X., Ladisch M. Human pathogens in plant biofilms: formation, physiology, and detection. *Biotechnol. Bioeng*, 2017, vol. 114, no. 7, pp. 1403–1418. DOI: 10.1002/bit.26247
22. Dudchik N.V. Investigation of the properties of the soil microbial consortium as a test objects for estimation of integral toxicity. *Gigiena i sanitariya*, 2012, vol. 91, no. 5, pp. 82–84 (in Russian).

Dudchik N.V., Sychik S.I., Nezhvinskaya O.E., Kolomiets N.D., Fedorenko E.V., Drozdova E.V., Tonko O.V., Emel'yanova O.A. Bacterial profiles and phenotypic biomarkers of microbiota isolates in habitat: hazard identification factors. *Health Risk Analysis*, 2020, no. 2, pp. 92–100. DOI: 10.21668/health.risk/2020.2.10.eng

Получена: 17.05.2019

Принята: 03.06.2020

Опубликована: 30.06.2020