

**В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс**

**ТОКСИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИЙ  
*ESCHERICHIA COLI* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ  
ИХ СОДЕРЖАНИЯ В ВОДЕ НА ТЕСТ-ОРГАНИЗМЫ**

Институт коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского  
НАН Украины, г. Киев

*Проведен анализ цито- и генотоксических свойств питьевой воды, содержащей бактерии *E. coli*, с использованием тест-объектов и их клеток. Показана целесообразность применения методов биотестирования для комплексной оценки качества питьевых вод наряду со стандартными методами.*

**Ключевые слова:** бактерия *E. coli*, двойные ядра, лейкоцитарная формула крови, микроорганизмы, микроядра, питьевая вода, токсичность, тест-объекты.

**Введение.** Проблема обеспечения населения качественной питьевой водой с каждым годом усложняется. Практически все поверхностные и многие подземные воды по уровню загрязнения не соответствуют требованиям стандартов к источникам водоснабжения. Водопроводная вода становится активным фактором вредного воздействия на здоровье и первопричиной возникновения многих опасных массовых инфекционных заболеваний.

Возможные пути ухудшения качества питьевых вод связаны с изменениями их химического состава, радиационным и микробиологическим загрязнением, продолжительностью и условиями хранения, а также особенностями технологий водоподготовки [1].

Микробиологическим загрязнением называется негативное влияние микробных составляющих продуктов жизнедеятельности человека или животных, поступающих в водные объекты [2].

Загрязненность воды определяется по общему микробиологическому обсеменению и определению санитарно-показательных микроорганизмов – индикаторов наличия выделений человека или животных. В воды пресных водоемов вместе со сточными водами попадают

представители микрофлоры человека и животных (кишечная палочка, цитробактер, энтеробактерии, энтерококки, клостридии) и возбудители кишечных инфекций (брюшной тиф, паратиф, дизентерия, холера, лептоспироз, энтеровирусные инфекции). Загрязнения воды органическими веществами сопровождается увеличением бактерий и микоз. В результате вода становится фактором передачи возбудителей многих инфекционных заболеваний, некоторые из которых могут даже размножаться в воде (холерный вибрион, легионеллы) [3].

Исследование влияния *E. coli* на биологические объекты достаточно важно, поскольку этот микроорганизм очень распространен в природе, а его повышенная концентрация в продуктах питания и воде может пагубно влиять на человека, в частности вызвать дисбактериоз, а некоторые штаммы – даже холероподобные заболевания [4].

В норме непатогенные бактерии *E. coli* населяют кишечник человека, однако они могут способствовать развитию патологии при попадании в другие органы или полости человеческого тела. Например, если бактерия попадает в брюшную полость, может возникнуть перитонит. Инфицирующая доза зависит от типа и количества патогенной кишечной палочки (для энтеротоксигенной *E. coli* эта величина может составлять от 100 млн. до 10 млрд. бактерий, для энтероинвазивной и энтерогемморрагической *E. coli* – всего 10 бактерий). Наиболее восприимчивыми к заболеванию являются дети раннего возраста, пожилые и ослабленные люди [5].

Цель данной работы – определение влияния бактерии *E. coli* с разной концентрацией в питьевой воде на тест-объекты: беспозвоночные животные – цериодафнию *Ceriodaphniaaffinis* [6] и гидру *Hydraattenuate* [7]; позвоночные животные – рыбу *Brachidaniorerio* [8]; растения – лук *Alliumcepa* [9]. Также необходимо было определить ее влияние на гематологические и цитогенетические показатели некоторых тканей рыб *Brachidaniorerio* [10, 11].

Так как рыбы обычно реагируют на токсиканты подобно высшим позвоночным, например млекопитающим [12], они могут быть использованы для обнаружения веществ, которые вызывают канцерогенный эффект у человека. Рыбы могут стать "контролем" потенциального генотоксического воздействия на человека вредных веществ в воде [13].

Образование микроядер, фрагментация хромосом часто возникает в процессе развития онкозаболевания, при вирусной инфекции, бактериальном заражении, а также воздействии на клетки ионизирующего облучения и различных мутагенов.

**Методика эксперимента.** В работе использовали штамм *E. coli* K-12, полученный из коллекции Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (г. Москва). Культуру бактерий выращивали в мясопептонном бульоне до логарифмической стадии роста (три – четыре часа), центрифугировали, трижды отмывали и ресуспендировали в фосфатном буфере до плотности 10<sup>8</sup> КОЕ/см<sup>3</sup>. Полученный осадок отмывали трижды в физиологическом растворе (0,9 % NaCl) и ресуспендировали в этом же растворе до плотности 10<sup>8</sup> КОЕ/дм<sup>3</sup>. Исходную суспензию необходимого объема вносили в заранее приготовленную фасованную питьевую воду.

Для исследования качества питьевых вод с микробиологическим загрязнением использовали фасованную негазированную питьевую воду, относящуюся по результатам комплексного биотестирования к I классу категории "безопасные воды". По технологии эту воду добывают из подземного источника и фасуют без разрыва струи, не контактируя с атмосферным воздухом. Вода содержала *E. coli* при концентрации в диапазоне 10<sup>2</sup> – 10<sup>6</sup> на 1 см<sup>3</sup>; контролем служила фасованная питьевая вода без обсемененности микроорганизмами.

Биотестирование проводили на тест-организмах (рыбы *Brachidaniorerio*, цериодафния *Ceriodaphniaaffinis*, гидра *Hydraattenuate* и лук *Alliumcepa*). Использовали по 10 особей каждого вида организма, при этом помещали на 96 ч в каждую исследуемую воду.

При определении влияния бактерии *E. coli* на лейкоцитарную формулу крови и частоту возникновения ядерных нарушений в клетках различных органов рыб от каждой особи на четвертые сутки брали образцы тканей хвостового плавника, жабр и крови. Препараты анализировали под световым микроскопом при общем увеличении  $\times 1000$ . На каждом препарате просматривали 3000 клеток, для анализа лейкоцитарной формулы крови подсчитывали 250 клеток. Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента;  $p < 0,05$  считали статистически значимым.

**Результаты и их обсуждение.** При проведении экспериментов по биотестированию фасованной воды с концентрацией бактерий *E. coli* в диапазоне 10<sup>2</sup> – 10<sup>6</sup> на 1 см<sup>3</sup> были получены данные на организменном уровне (табл. 1).

Таблица 1. Тест-организмы после экспозиции (96 ч) в исследуемых образцах фасованной питьевой воды с разной концентрацией *E. coli*

Концентрация бактерий	Погибшие особи, %			Отклонение от контроля, %
	Цериодафния <i>Ceriodaphniaaffinis</i>	Гидра <i>Hydraattenuate</i>	Рыба <i>Brachidaniorerio</i>	
Контроль	0	0	0	0
10 <sup>2</sup>	0	0	0	0
10 <sup>3</sup>	0	0	0	0
10 <sup>4</sup>	20	20	0	-10
10 <sup>5</sup>	70	30	0	-20
10 <sup>6</sup>	100	40	0	-40

Результаты комплексного биотестирования с помощью животных и растительных тест-организмов свидетельствуют, что изучаемые образцы фасованной питьевой воды с концентрацией бактерий 10<sup>2</sup> и 10<sup>3</sup> не вызывают острую и хроническую токсичность первых. Также они не влияют на нормальную жизнедеятельность гидробионтов и размерно-весовые показатели корешков проросшего репчатого лука в течение 96 ч. Начиная с плотности микроорганизмов 10<sup>4</sup> на 1 см<sup>3</sup>, регистрируется хроническая токсичность для *Ceriodaphniaaffinis*, *Hydraattenuate* и *Alliumcepa*.

Питьевая вода с бактериальным обсеменением, в которой плотность микроорганизмов составляет 10<sup>5</sup> на 1 см<sup>3</sup>, вызывает острую токсичность у ракообразных, хроническую токсичность – у гидр и растительных тест-организмов.

Плотность микроорганизмов в воде, составляющая 10<sup>6</sup> микроорганизмов на 1 см<sup>3</sup>, вызывает 100%-ную гибель цериодафний, достоверное угнетение (на 40%) развития и роста корешков репчатого лука, а также хроническую токсичность у пресноводных гидр *Hydraattenuate*. Не исключено, что потребление воды с таким содержанием микроорганизмов повышает степень риска для здоровья человека.

Особенно чувствительным тест-организмом оказалась цериодафния. Будучи животным, фильтрующим воду в поисках кормовых одноклеточных организмов (тех же бактерий), *Ceriodaphniaaffinis* проявила

высокую чувствительность к микробиологическому обсеменению воды. Это противоречие можно объяснить высокой концентрацией метаболитов бактерий, выделяемых в водную среду, которые значительно ухудшают ее качество.

Во время проведения эксперимента по биотестированию питьевой воды с концентрацией *E. coli* в диапазоне  $10^2 - 10^6$  на  $1 \text{ см}^3$  смертность тест-организмов (*Brachidaniorerio*) в течение 96 ч не была зафиксирована ни в одной из исследуемых проб, однако изменялось их физиологическое поведение. Так, к концу эксперимента они были неактивными и малоподвижными.

По сравнению с вышеперечисленными гидробионтами рыба стоит выше по экологической нише. Непосредственно живя в воде, цикл жизни и химические реакции в организме у рыб происходят быстрее, чем у других позвоночных, к которым она близка по своим органам и системам (лягушки, крысы, кролики, птицы) [14]. Мясо рыбы по химическому составу подобно мясу млекопитающих. Оно содержит много белков, жира и воды, но более рыхлая консистенция мяса рыб способствует быстрому распространению микроорганизмов в ее теле. В норме мышечная ткань рыб, как и мясо животных, не содержит микроорганизмов. Микробная обсемененность органов рыбы находится в прямой зависимости от количества микрофлоры [15].

Для более детального исследования влияния бактерии *E. coli* на организм рыб был проведен опыт на клеточном уровне (табл. 2, 3).

Универсальность клеточной организации рыб открывает широкие возможности для токсикологических исследований с последующей экстраполяцией полученных результатов на клетки и организм человека [1, 11].

Наши многочисленные исследования свидетельствуют о перспективности использования гематологических показателей организмов рыб в биотестировании. Для характеристики структурных и количественных изменений важнейших компонентов клеточного ядра (хромосом и генов), являющихся носителями генетической информации, был использован цитогенетический метод – микроядерный тест [10, 11].

При изучении влияния данных образцов на показатели форменных элементов крови рыб цитотоксический эффект проявляли все исследуемые воды в сравнении с данными контрольной воды. В фасованной питьевой воде с концентрацией бактерий *E. coli* в диапазоне  $10^2 - 10^6$  на

1 см<sup>3</sup> наблюдалось дозозависимое изменение показателей формулы крови рыб (см. табл. 2).

Таблица 2. Изменение состава форменных элементов крови рыбы *Brachidaniorerio (L.)* после экспозиции (96 ч) в исследуемых образцах фасованной питьевой воды с разной концентрацией *E. coli*

Концентрация бактерий	Форменные элементы крови рыбы, %					
	Лимфоциты	Моноциты	Сегментоядерные нейтрофилы	Палочкоядерные нейтрофилы	Базофилы	Эозинофилы
Контроль	91,6	3,2	3,6	1,2	0,4	0
10 <sup>2</sup>	87,2	3,6	4,8	1,6	1,6	1,2
10 <sup>3</sup>	83,2	4,4	4,8	2,0	3,2	2,4
10 <sup>4</sup>	76,4	8,8	4,4	2,4	4,8	3,2
10 <sup>5</sup>	74	10	4,5	2,5	5,4	3,6
10 <sup>6</sup>	73,6	10	4,6	2,6	5,6	3,6

Уменьшение количественной доли лимфоцитов с 91,6% в контроле до 73,6 % в воде, содержащей 10<sup>6</sup> *E. coli* на 1 см<sup>3</sup>, происходило за счет увеличения моноцитов, базофилов, эозинофилов и нейтрофилов. Такое соотношение лейкоцитов в крови свидетельствует о том, что высокая концентрация метаболитов бактерий, выделенных в водную среду, значительно ухудшает ее качество и вызывает воспалительный процесс в организме.

Полученные данные указывают, что в тканях *Brachidaniorerio (L.)* (в эритроцитах крови, на клетках жабр, в эпителиальных клетках хвостового плавника) встречаются двойные ядра и микроядра, что свидетельствует о генотоксическом эффекте исследуемых вод с бактериями *E. coli*. Выявлено, что с повышением концентрации бактерий увеличивается количество клеток с аномальными ядрами.

Таким образом, повышенная концентрация метаболитов бактерий *E. coli*, выделенных в водную среду, значительно ухудшает ее качество, ингибирует рост корешков на растительных организмах, проявляет хроническую токсичность на гидре и вызывает острую токсичность на цериодафии.

Таблица 3. Генотоксическое влияние фасованной питьевой воды с разной концентрацией *E. coli* на клетки *Danio rerio* (L.)

Тип клеток	Показатели, %	Концентрация бактерий					
		Контроль	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
Эритроциты	мЯ	0	0,33	0,33	0,67	1	1
	2N	0	0,33	0,67	1	1	1
Клетки жабр	мЯ	0	0	0	0,67	0,67	0,67
	2N	0	0,67	1	0,67	1	1
Клетки хвостового плавника	мЯ	0	0,33	0,33	0,33	1	0,67
	2N	0	0	0,67	1	0,67	1

Согласно полученным результатам на клеточном уровне отклонения от контроля наблюдаются уже с концентрации микроорганизмов, составляющей 10<sup>2</sup>. Даже при обнаружении бактерий в незначительном количестве возникают воспалительные процессы, которые отражаются на гематологических показателях лейкоцитов крови рыб.

Лейкоциты играют очень важную роль в защите организма от бактериальных и грибковых инфекций. Рост количества нейтрофилов в крови – это ответ организма на бактериальные и многие другие инфекции. Возникновение лимфопении (уменьшение количества лимфоцитов) характерно для начальной стадии инфекционно-токсического процесса и связано с их миграцией из сосудов в ткани к очагам воспаления.

Исследуемые образцы фасованной питьевой воды с разными концентрациями бактерий достоверно увеличивают частоту ядерных нарушений в тканях организма рыб, т.е. вызывают генотоксические эффекты.

При попадании в организм человека кишечной палочки *E. coli*, независимо от ее количества или концентрации, в тканях возникает воспалительный процесс того или иного органа (кальпит, простатит, перитонит и др.), что приводит к сбою иммунной системы.

**Выводы.** Необходимость в проведении таких исследований обусловлена тем, что в питьевой воде, включая фасованную, повсеместно определяется кишечная палочка. Однако влияние *E. coli* и продуктов ее метаболизма на токсичность питьевой воды не изучено. Общепринятые исследования по использованию *E. coli* как показателя санитарно-

гигиенического состояния воды не включают токсическую оценку воды, обсемененной кишечной палочкой.

Полученные данные показали, что использование как тест-организмов, так и их клеток целесообразно применять для комплексной оценки качества питьевых вод совместно со стандартными методами.

Структурные и количественные изменения ядер и клеток наблюдаются уже при концентрации *E. coli*  $10^2$ . Изменение компонентов клеточного ядра, которые являются носителями генетической информации, способствует мутациям клеток. Это может привести к ошибочной диагностике того или иного заболевания, а также к пролиферации онкологических клеток.

Согласно действующим гигиеническим требованиям Всемирной организации здравоохранения к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения общее количество кишечных палочек *E. coli* в 1 см<sup>3</sup> воды не должно превышать 3 КОЕ. Наши же исследования доказывают, что наличие бактерии *E. coli* в питьевой воде в любом количестве категорически недопустимо.

**Резюме.** Проведено аналіз цито- та генотоксичних властивостей питної води, що містить бактерії *E. coli*, з використанням тест-об'єктів та їх клітин. Результати досліджень показали доцільність застосування методів біотестування для комплексної оцінки якості питних вод, поряд зі стандартними методами.

*V.V. Goncharuk, M.R. Vergolias*

## **INVESTIGATION OF TOXIC EFFECTS *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA IN RELATION TO THEIR CONTENTS IN WATER TO TEST-ORGANISMS**

### **Summary**

The analysis of cyto- and genotoxic properties of drinking water containing bacteria *E. coli* with using the test objects and cells. The results showed the feasibility of biological testing methods for comprehensive assessment of drinking water quality, along with the standard methods.



## Список использованной литературы

- [1] *Arkipchuk V.V., Goncharuk V.B.* // *J. Water Chem. and Technol.* – 2004. – **26**, N4. – P. 48 – 54.
- [2] *Мокиенко А.В., Петренко Н.Ф., Гоженко А.И.* // Гигиена населен. мест. – 2006. – Вып. 47. – С.120 – 130.
- [3] *Теплер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И.* Практикум по микробиологии. – М.: Колос, 1993. – 175 с.
- [4] *Жданов В.М., Львов Д.К.* Эволюция возбудителей инфекционных болезней. – М.: Медицина, 1984. – 275 с.
- [5] *Ashbolt N. J.* // *Toxicol.* – 2004. – N198. – P. 229 – 238.
- [6] *КНД 211.1.4.056-97.* Методика визначення хронічної токсичності води на ракоподібних *Ceriodaphnia affinis Lilljeborg.* – К., 1997. – 24 с.
- [7] *Trottier S., Blaise C., Kusui T., Johnson E.M.* // *Environ. Toxicol. Water Qual.* – 1997. – **12**. – P. 265 – 271.
- [8] *ДСТУ 4074-2001* Методика визначення гострої летальної токсичності води на рибах *Brachidaniorerio.* – К., 2001. – 21 с.
- [9] *Fiskesjo G.* // *Environ. Toxicol. Water Qual.* – 1993. – **8**. – P. 461 – 470.
- [10] *Пат. 93964 Україна, МПК G 01N 33/18 / В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс.* – Оpubл. 25.03.2011, Бюл. №6.
- [11] *Пат. 88491 Україна, МПК G 01N 33/18 / В.В. Гончарук, М.Р. Верголяс, І.В. Болтина.* – Оpubл. 21.02.2009, Бюл. №4.
- [12] *Al-Sabti K.* // *Mutation Res.* –1995. – **23**. – P. 121 – 135.
- [13] *Junk S.M., Murch A.R., Dharmarajan A., Yoyich J.L.* // *J. Assisted Reprod. and Genetics.* – 2002. – **19**. – P. 67 – 71.
- [14] *Верголяс М.Р., Гончарук В.В.* // Зб. наук. праць (присвячено 90-річчю від часу заснування Української академії наук). – 2008. – **4**. – С. 60 – 63.
- [15] *Мудрецова-Висс К.А.* Микробиология. – М.: Изд-во "Экономика", 1985. – С. 79.

Поступила в редакцию 24.05.2013 г.