

Бойко О.В., Доценко Ю.И., Гудинская Н.И., Бойко В.И., Мухамедзянова Р.И.,  
Козак Д.М., Стенькин Ф.С.

## Влияние поллютантов на биохимические свойства микроорганизмов

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава  
России, 414000, Астрахань

**Введение.** Развитие способов определения опасности веществ, загрязняющих окружающую среду, альтернативных рутинным методам оценки здоровья различных профессиональных групп людей и тестам на лабораторных животных, оценивалось и обобщалось в ряде специальных работ, и конкретных фактических данных в этом направлении накапливается всё больше. Анализ патогенных характеристик микрофлоры, изолируемой из загрязнённых местообитаний или изменённой под воздействием поллютантов, позволяет не только оценить опасность возникновения заболеваний микробной этиологии, но и установить влияние на этот процесс модифицирующих факторов.

**Материал и методы.** Наши исследования проводились на 150 культурах *Klebsiella pneumoniae*, подвергшихся воздействию диэтанолламина, фенола, серной и азотной кислот, взятых на уровне их ПДК. В качестве контроля использовались те же культуры, но не прошедшие инкубацию с поллютантами. Факторы патогенности определялись традиционными методами и методами в собственной модификации (РНКазная активность) с использованием стандартных реактивов, наборов и сред.

**Результаты.** После контакта со всеми поллютантами выявлено достоверное повышение адгезивной, антимуноглобулиновой, лизоцимной, антилизоцимной, РНКазной активности микроорганизмов, способности противостоять антибактериальному действию сыворотки крови, а также повреждающему действию лактоферрина. Возросла способность бактерий к синтезу вещества, иммунологически сходного с лактоферрином человека. В то же время липазная активность, относимая преимущественно к факторам, определяющим способность бактерий выживать во внешней среде, снизилась.

**Обсуждение.** Таким образом, резюмируя результаты работы, необходимо отметить следующее: биохимия бактерий, будучи самостоятельным и цельным разделом современной микробиологии, увязывает в единый узел, казалось бы, далёкие друг от друга вопросы: изменения факторов патогенности и персистенции микроорганизмов и техногенную изменчивость окружающей среды. Весьма актуальная сегодня, эта проблема может многократно обостриться в ходе дальнейшего научно-технического прогресса.

**Ключевые слова:** поллютанты; микроорганизмы; биохимия бактерий; факторы патогенности; диэтанолламин; фенол; серная кислота; азотная кислота.

**Для цитирования:** Бойко О.В., Доценко Ю.И., Гудинская Н.И., Бойко В.И., Мухамедзянова Р.И., Козак Д.М., Стенькин Ф.С. Влияние поллютантов на биохимические свойства микроорганизмов. *Гигиена и санитария*. 2020; 99 (4): 368–378. DOI: <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-4-368-378>

**Для корреспонденции:** Бойко Оксана Витальевна, доктор мед. наук, доцент, профессор кафедры биологической химии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет», 414000, Астрахань. E-mail: obouko08@mail.ru

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Участие авторов:** Бойко О.В. — концепция и дизайн исследования, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи; Доценко Ю.И. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Гудинская Н.И. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Бойко В.И. — концепция и дизайн исследования, редактирование, ответственность за целостность всех частей статьи; Мухамедзянова Р.И. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Козак Д.М. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Стенькин Ф.С. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Поступила: 07.12.2019  
Принята к печати: 25.02.2020  
Опубликована: 26.05.2020

Boiko O.V., Dotsenko Yu.I., Gudinskaya N.I., Boiko V.I., Mukhamedzyanova R.I.,  
Kozak D.M., Stenkin F.S.

## Effect of pollutants on biochemical properties of microorganisms

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, 414000, Russian Federation

**Introduction.** The development of different ways of identifying hazard of substances, polluting the environment, that are alternative to routine methods for assessing health of different professional groups of people, as well as to tests on laboratory animals, has been assessed and summarized in a number of papers, and there is a growing volume of actual data on this issue. The analyzing pathogenic properties of microflora, isolated from polluted habitats or changed under the effect of pollutants, allows both assessing the risk of diseases with microbial etiology and identifying the influence of modifying factors on this process.

**Materials and methods.** The research was performed on 150 cultures of *Klebsiella pneumoniae*, exposed to diethanolamine, phenol, sulfuric and nitric acids, taken at the level of their threshold limit value. The same cultures incubated without pollutants were used as a control group.

*Pathogenic factors were determined with the use of traditional methods, our modified methods (RNAase activity) and standard agents, kits and media.*

**Results.** *The contact with all the pollutants resulted in a fair increase in adhesive, anti-Ig, lysozyme, anti-lysozyme and RNAase activities of microorganisms, their resistance to antibacterial action of blood serum, as well as to damaging action of lactoferrin. The bacteria increased their ability to synthesize a substance, immunologically similar to human lactoferrin. At the same time, there was a decrease in lipase activity, primarily referred to factors determining the bacterial ability to survive in the environment.*

**Discussion.** *Therefore, the paper results can be presented as follows: being an independent and holistic section of modern microbiology, bacterial biochemistry unites the issues appeared to be far from each other – changes in factors of pathogenicity and persistence of microorganisms and technogenic changeability of the environment. Being quite urgent today, this problem may become aggravated in the course of further technological progress.*

**Key words:** *pollutants; microorganisms; bacterial biochemistry; pathogenic factors; diethanolamine; phenol; sulfuric acid; nitric acid.*

**For citation:** Boiko O.V., Dotsenko Yu.I., Gudinskaya N.I., Boiko V.I., Mukhamedzyanova R.I., Kozak D.M., Stenkin F.S. Effect of pollutants on biochemical properties of microorganisms. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99(4): 368-378. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.33029/0016-9900-2020-99-4-368-378>

**For correspondence:** Oksana V. Boiko, MD., PhD., Associate Professor of the Department of Biochemistry, Astrakhan State Medical University, 121 Bakinskaya Str., 414000, Astrakhan, Russian Federation. E-mail: oboiko08@mail.ru

#### Information about the authors:

Boiko O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3882-9300>;

Dotsenko Yu.I., <https://orcid.org/0000-0002-6016-7246>

Gudinskaya N.I., <https://orcid.org/0000-0002-2643-4806>;

Boiko V.I., <https://orcid.org/0000-0002-3662-7724>

Mukhamedzyanova R.I., <https://orcid.org/0000-0001-7445-0598>;

Kozak D.M., <https://orcid.org/0000-0002-6653-7658>

Stenkin F.S., <https://orcid.org/0000-0002-8151-9466>

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Contribution:** Boiko O.V. – concept and design of the study, editing, approval of the final version of the manuscript, responsibility for the integrity of all parts of the manuscript; Dotsenko Yu.I. – concept and design of the study, collection and processing of material, statistical processing, writing text; Gudinskaya N.I. – concept and design of the study, collection and processing of material, statistical processing, writing text; Boiko V.I. – concept and design of the study, editing; Mukhamedzyanova R.I. – concept and design of the study, collection and processing of material, statistical processing, writing text; Kozak D.M. – concept and design of the study, editing; Stenkin F.S. – concept and design of the study, editing. All co-authors - approval of the final version of the manuscript, responsibility for integrity of all the parts of the manuscript.

Received: December 07, 2018

Accepted: February 25, 2019

Published: May 26, 2020

## Введение

Известно, что одной из целей любого экологического исследования является определение степени потенциальной опасности различных компонентов внешней среды для здоровья человека, а также животных и растительного мира. Всеобщий интерес к экологическим вопросам побудил провести определённую ревизию санитарно-гигиенических приёмов, среди которых заметный импульс получили микробиологические методики, постепенно занимающие всё более видное место [1–4]. Развитие способов определения опасности веществ, загрязняющих окружающую среду, альтернативных рутинным методам оценки здоровья различных профессиональных категорий людей и тестам на лабораторных животных, нередко определяется прежде всего этическими нормами, а также сокращением материальных и временных затрат. Микроорганизмы же в силу своей убиквитарности, относительной толерантности к губительному действию факторов внешней среды и высокой биологической пластичности достаточно быстро реагируют на изменение качества среды обитания, что делает достаточно привлекательным исследование объективных связей в системе техногенное загрязнение – свойства микрофлоры как одного из возможных методов оценки вредного воздействия антропогенных факторов на окружающую среду [5–10]. Наряду с этим совершенно определённая роль микроорганизмов в патологии человека позволяет связать регистрируемые в них под воздействием внешних факторов изменения с особенностями возникновения и развития различных состояний инфекционного генеза.

Цель нашей работы – попытка проследить подобные изменения, возникающие в бактериальной клетке под воздействием нескольких химических веществ, достаточно часто встречающихся в бытовых и промышленных стоках, причём некоторые из них являются компонентами кислотных

## Introduction

It is well known that one of the objectives of any environmental study is to identify a degree of possible hazards of different environmental components to human health, animals and plants. A general interest in environmental issues has stimulated to make a certain revision of sanitary and hygienic methods, among which bacteriological techniques, taking more and more leading positions, have acquired momentum [1–4]. The development of different ways of identifying hazard of substances, polluting the environment, that are alternative to routine methods for assessing health of different professional groups of people, as well as to tests on laboratory animals, is often determined mainly by ethical standards, as well as by material cost and time saving. Due to their ubiquitous nature, relative tolerance to a pernicious effect of environmental factors and high biological flexibility, microorganisms react quite rapidly to changes in quality of the habitat, which makes it very appealing to study objective links in the system “human-induced pollution – properties of microorganisms” as one of possible methods for assessing harmful effects of anthropogenic factors on the environment [5–10]. At the same time, a definite role of microorganisms in human pathology allows to link their changes, registered under the effect of external factors, with peculiarities of emergence and development of different states of infectious genesis.

The paper aims at identifying such changes in a bacterial cell under the effect of several chemical substances that are often found in domestic and industrial wastewater, and some of them are also acid rain components. These are diethanolamine, phenol, sulfuric and nitric acids. The grounds for conducting such a research were the ev-

дождей. Это диэтанолламин, фенол, серная и азотная кислоты. Основанием для проведения подобного рода исследований послужили сведения о том, что под воздействием факторов техногенной природы происходит ускорение темпов изменчивости микроорганизмов, что рассматривается как «искусственная эволюция возбудителей инфекционных заболеваний» [5]. С этих позиций анализ качественных характеристик микрофлоры, изолируемой из антропогенно загрязнённых экологических ниш или изменённой под воздействием поллютантов, позволяет не только оценить опасность распространения заболеваний бактериальной этиологии, но и охарактеризовать интенсивность и направленность влияния на этот процесс модифицирующих факторов [11–15].

Особое внимание при этом следует обращать на изучение изменчивости факторов вирулентности и персистенции инфекционных агентов, определяющих их взаимодействие с организмом хозяина. Экспериментальным обоснованием для подобного подхода послужили исследования изменчивости индикаторных свойств санитарно-показательных микроорганизмов рода *Staphylococcus* под влиянием природного сероводородсодержащего газа Оренбургского, Карачаганакского и Астраханского месторождений, проведённые О.В. Бухариным и соавт. [5].

## Материал и методы

В качестве объекта исследования были выбраны бактерии рода *Klebsiella pneumoniae*. Клебсиеллы, как известно, аутохтонные компоненты природных экосистем. Они, как и другие сапронозы, входят в экологически обособленную и разнородную группу микроорганизмов, потенциально патогенных для человека [16, 17]. Кроме того, клебсиеллы достаточно своеобразны в экологическом и эпидемиологическом отношении: обитая в природе, они практически безопасны для человека, однако эпидемиологическая значимость их резко возрастает, когда человек вводит эти микроорганизмы в своё непосредственное окружение. Именно недооценка их экологической гибкости и потенциала изменчивости приводит к возникновению инфекций, называемых С.В. Прозоровским и соавт. «продуктом цивилизации», в связи с чем изучение трансформации факторов патогенности под влиянием ксенобиотиков у клебсиелл и подобных им микроорганизмов кажется нам актуальным и перспективным направлением [18–20].

Критериями включения в исследование было соответствие выделенных микроорганизмов роду *Klebsiella pneumoniae*, которое устанавливалось согласно приказу № 535 от 22 апреля 1985 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Для этого применялись следующие лабораторные методы:

1) выделение чистых культур возбудителей в бактериологических анализах мазков от пациентов и проб из объектов окружающей среды и их посев на соответствующие питательные среды в зависимости от предполагаемого вида возбудителя. Забор материала производился с помощью стержня со стерильным тампоном, который помещался в стерильную пробирку, не касаясь его края, или помещался в стерильную посуду. Посев осуществлялся в ламинарном шкафу, гарантирующем стерильность рабочей зоны. Культивирование и выращивание колоний происходило на чашках Петри. Штаммы полученных культур помещались на предметное стекло для дальнейшего окрашивания мазков по одному из методов (Граму, Цилю–Нильсену) и микроскопического изучения морфологии микроорганизмов:

- размер и форма бактериальной клетки;
- наличие капсул, жгутиков, спор;
- тинкториальные свойства (отношение микроорганизма к окрашиванию);

идентичности, что ускоряется под воздействием техногенных факторов, которые рассматриваются как «искусственная эволюция инфекционных агентов» [5]. Из этой линии рассуждений, анализ факторов патогенности микрофлоры, изолированной из загрязнённых экологических ниш, позволяет не только оценить опасность распространения заболеваний бактериальной этиологии, но и в деталях представить интенсивность и тип влияния на этот процесс конкретных ксенобиотиков [11–15].

Здесь особое внимание следует уделять исследованиям на изменчивость вирулентности и факторы персистенции инфекционных агентов, определяющие их взаимодействие с организмом хозяина. Экспериментальное обоснование для такого подхода – серия исследований на изменчивость индикаторных свойств санитарно-показательных микроорганизмов, экспонированных к природному сероводороду Оренбургского, Карачаганакского и Астраханского месторождений, проведённые О.В. Бухариным и соавт. [5].

## Material and Methods

*Klebsiella pneumoniae* bacteria were used as a subject of research. As is well known, *Klebsiella* are autochthonous components of natural ecosystems. Like other sapronoses, they belong to an ecologically isolated and heterogeneous group of microorganisms that are potentially pathogenic for humans [16–17]. Besides, *Klebsiella* are quite specific in terms of ecology and epidemiology: living in nature, they are almost harmless for human, but their epidemiological significance increases dramatically when humans introduce these microorganisms into their immediate environment. This very underestimation of their ecological flexibility and changeability potential leads to infections called “civilization product” by S.V. Prozorosky and his co-authors, for which reason a study on pathogenicity factor transformation under the exposure of xenobiotics in *Klebsiella* and similar microorganisms seems to be urgent and promising [18–20].

Inclusion criteria for the isolated microorganisms were their concordance with *Klebsiella pneumoniae*, determined according to Order No.535 “On Unification of Microbiological (Bacteriological) Examination Methods, Applied in Treatment and Diagnostic Laboratories of Medical and Preventive Institutions” dated April 22, 1985. For this purpose, the following laboratory methods were applied:

1) isolation of pure cultures of the agents in bacterial tests of the patients’ smears and environmental samples and their inoculation in respective media, depending on a supposed type of agent. The material was sampled with a rod and a sterile swab which was put into a sterile tube without touching its brim, or was put into sterile dishes. The inoculation was conducted in a laminar flow unit, guaranteeing the working place sterility. Colonies were cultivated and grown in Petri dishes. Strains of the obtained cultures were placed on a slide for further staining of the smears by one of the methods (Gram, Ziehl-Neelsen) and microscopy of the microorganism morphology:

- Size and shape of a bacterial cell;
- Presence of capsules, flagella and spores;
- Tinctorial properties (microorganism’s reaction to staining).

2) concordance of biological activity of the isolated microorganisms with the biological activity of *Klebsiella* was tested with *Enterotest 2* test kit, *Lachema* company, the Czech Republic.

All the examined strains were typical by their cultural, morphological and biochemical properties. If a microorganism mismatched at least one of the above criteria, it was excluded from further studies.

2) соответствие биохимической активности выделенных микроорганизмов биохимической активности клебсиелл с использованием тест-система Enterotest 2 (АО «Lachema», Чехия).

Все включенные в исследование штаммы были типичными по своим культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам. Несоответствие микроорганизмов хотя бы одному из вышеперечисленных критериев служило основанием для его исключения из дальнейших исследований.

С каждым из поллютантов прошли инкубацию 150 культур.

В качестве контрольной группы использовались те же 150 культур, что и в опыте, прошедшие инкубацию в тех же условиях, что и опытные, но без воздействия поллютантов.

Из этих 150 штаммов:

- 30 штаммов клебсиелл были выделены из материала от пациентов Астраханской областной инфекционной больницы (из фекалий, носоглотки, зева). От каждого пациента было выделено по одному штамму.
- 80 штаммов – из фекалий лиц, обследованных в бактериологической лаборатории Центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора в Астраханской области. От каждого пациента было выделено по одному штамму.
- 40 штаммов из объектов внешней среды (воды поверхностных водоёмов и продуктов растениеводства). Из каждого образца было выделено по одному штамму.

Для дозированного посева использовали взвеси микроорганизмов, приготовленные по стандарту мутности (ГИСК им. Тарасевича) из расчёта, что 10 международных единиц бактериологического стандарта соответствует 850 млн м.т./мл бактерий. При этом все микроорганизмы суспендировали в 0,7% растворе хлорида натрия. Для контроля посевной дозы из пробирок, содержащих, по расчёту, 1000 м.т. в 1 мл, производили посев 0,1 мл на 3 чашки с питательным агаром и подсчитывали число выросших колоний.

Диэтанолламин, фенол, серную и азотную кислоты вносили в предварительно простерилизованную водопроводную питьевую воду (90 мин при 1,5 атм) в концентрациях, не превышавших ПДК. Конечные концентрации составили для фенола 0,25 мг/л, диэтанолламина – 0,01 мг/л, серной кислоты – 0,018 мг/л, для азотной кислоты – 0,015 мг/л [17].

Лабораторное исследование проб «Вода питьевая» проводилось в аккредитованном испытательном лабораторном центре Федерального бюджетного учреждения здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области». Аттестат аккредитации № RA.RU.510453. Дата внесения сведений в реестр аккредитованных лиц 19.12.2016 г.

Обеззараживание воды из поверхностного водоемника (р. Волга) проводится методом хлорирования. Состав воды представлен в табл. 1.

Все испытуемые штаммы, выращенные на МПА, по одному вносили во флаконы с 50 мл каждого раствора поллютанта, а также контрольный флакон в дозе  $10^3$  микробных клеток на 1 мл приготовленного по стандарту мутности. После 10 дней инкубации при комнатной температуре был произведён забор из флаконов бактерий и последующий их посев на плотный питательный агар. Выросшие клебсиеллы в дальнейшем использовали для определения их факторов патогенности и персистенции.

1. Для обнаружения глицеролэстергидролаз (липаз) использовали агар с твином 60. Инкубацию посевов проводили при 37 °С в течение 24 ч. При положительной реакции наблюдалось образование жёлтого ореола вокруг колоний, отличного от общего красного цвета среды. В качестве индикатора использовали фенолрот в концентрации 0,5% [21].

2. Наличие лизоцимной (ЛА) и антилизоцимной (АЛА) активности у микроорганизмов определяли методом отсроченного антагонизма. В работе использовали лизоцим фирмы Sigma-Aldrich (Швейцария). В качестве индикатор-

150 cultures were incubated with each pollutant.

The same 150 cultures, incubated under the same conditions but not exposed to the pollutants, were used as a control group.

From these 150 strains:

- 30 strains of *Klebsiella* were isolated from the material of patients of the Astrakhan Regional Infectious Hospital (from feces, nasopharynx and pharynx), one strain isolated from each patient.
- 80 strains – from feces of patients, examined at the bacteriological laboratory of the Centre for State Sanitary and Epidemiological Supervision in Astrakhan region, one strain isolated from each patient.
- 40 strains – from environmental objects (surface waters and crop products), one strain isolated from each sample.

Suspensions of microorganisms, prepared according to the turbidity standard (State Research Institute of Standardization and Control of Medical Biological Preparations named after L.A. Tarasevich) were used for dosed inoculation assuming that 10 international units of the bacteriological standard correspond to 850 million mb/ml of bacteria. All the microorganisms suspended in 0.7% solution of sodium chloride. To control the inoculation dose, 0.1 ml inoculation was made from the tubes, containing, as calculated, 1000 mb in 1 ml, in 3 cups with a nutrient agar, and then a number of grown colonies was count.

Diethanolamine, phenol, sulfuric and nitric acids were introduced into pre-sterilized tap drinking water (90 minutes under 1.5 atm) in concentrations that did not exceed their threshold limit value (TLV). Final concentrations were 0.25 mg/l for phenol, 0.01 mg/l for diethanolamine, 0.018 mg/l for sulfuric acid and 0.015 mg/l for nitric acid [17].

Laboratory examination of the samples “Drinking water” was conducted at the accredited testing laboratory centre of the Federal Budgetary Healthcare Institution “Hygienic and Epidemiological Centre of Astrakhan Region”. Accreditation certificate No. RA.RU.510453, an entry on the accredited persons was made in the register on 19.12.2016.

Water from the surface water source (Volga river) was sterilized with the method of chlorination. The water composition is presented in Table 1.

All the test strains, cultured in a meat infusion agar (MIA), were put one by one into bottles with 50 ml of each solution of a pollutant, as well as into the control bottle, in the dose of  $10^3$  microbial cells per 1 ml, made according to the turbidity standard. After the 10-day incubation period at room temperature, the bacteria were taken from the bottles and were inoculated into a dense nutrient agar. Grown *Klebsiella* were further used to identify their factors of pathogenicity and persistence.

1. Agar with tween 60 was used to identify glycerol ester hydrolases (lipases). The inoculation was incubated under 37° C during 24 hours. When the reaction was positive, there was a yellow halo around the colonies which was different from the red color of the medium. Phenol red with the concentration of 0.5% was used as an indicator [21].

2. Presence of lysozyme activity (LA) and anti-lysozyme activity (ALA) in the microorganisms was assessed with the use of the deferred antagonism method. Lysozyme, produced by Sigma-Aldrich, Switzerland, was used in the present study, and the strain *Micrococcus lysodeicticus* (strain No. 2665 according to the State Research Institute of Standardization and Control of Medical Biological Preparations named after L.A. Tarasevich) was used as an indicative test strain [22].

Таблица 1

## Результаты лабораторного исследования проб «Вода питьевая»

Показатель	Результаты исследований	Гигиенический норматив, не более	НД на методы исследований
Запах при 20°, баллы	0	2	ГОСТ Р 57164-16
Запах при 60°, баллы	0	2	ГОСТ Р 57164-16
Привкус, баллы	0	2	ГОСТ Р 57164-16
Мутность, мг/дм <sup>3</sup>	1,37 ± 0,27	1,5 (2,0)	ГОСТ Р 57164-16 (длина волны 530 нм)
Цветность, градусы	13,4 ± 2,7	20 (35)	ГОСТ 31868-12
pH	7,34 ± 0,20	6,5–8,5	ПНДФ 14.1:2:3:4.121 -04
Аммиак (по азоту), мг/дм <sup>3</sup>	0,12 ± 0,02	2,0	
Нитрит ион, мг/дм <sup>3</sup>	0,0050 ± 0,0025	3,0	
Нитраты, мг/дм <sup>3</sup>	1,69 ± 0,34	45,0	ГОСТ 33045-14
Жёсткость общая, мгэкв/дм <sup>3</sup> (°ж)	2,85 ± 0,43	7,0	ГОСТ 31954-12
Сухой остаток (общая минерализация), мг/дм <sup>3</sup>	244,0 ± 22,0	1000,0	ПНДФ 14.1:2:4.114-97
Хлориды, мг/дм <sup>3</sup>	31,24 ± 4,69	350,0	ГОСТ 4245-72
Сульфаты, мг/дм <sup>3</sup>	52,42 ± 5,24	520,0	ГОСТ 4389-72
Железо, мг/дм <sup>3</sup>	0,14 ± 0,04	0,3	ГОСТ 4011-72
Фтор, мг/дм <sup>3</sup>	0,09 ± 0,01	1,5 (1,2)	ГОСТ 4386-89
Нефтепродукты, мг/дм <sup>3</sup>	0,011 ± 0,004	0,1	ПНДФ 14.1:2:4.128-98
Фенол, мг/дм <sup>3</sup>	0,00070 ± 0,00025	0,001	ПНДФ 14.1:2:4.182-02
АПАВ, мг/дм <sup>3</sup>	менее 0,025	0,5	ПНДФ 14.1:2:4.158-2000
Цинк, мг/дм <sup>3</sup>	0,0220 ± 0,0066	5,0	
Кадмий, мг/дм <sup>3</sup>	0,00057 ± 0,00017	0,001	
Свинец, мг/дм <sup>3</sup>	0,006 ± 0,0018	0,03	МУ 31-03/04
Медь, мг/дм <sup>3</sup>	менее 0,005	1,0	ГОСТ 31866-12
Мышьяк, мг/дм <sup>3</sup>	менее 0,001	0,05	МУ 31-09/04 ГОСТ 31866-12
Ртуть, мг/дм <sup>3</sup>	менее 0,00001	0,0005	МИ 2865-04
Марганец, мг/дм <sup>3</sup>	0,014 ± 0,004	0,1	ПНДФ 14.1:2:4.188-02
Алюминий, мг/дм <sup>3</sup>	0,018 ± 0,006	0,5	ГОСТ 18165-14

Table 1

## Results of the laboratory examination of the samples "Drinking water"

Determinable indicators	Examination results	Hygienic standard, max	Units of measurement (for columns 3 and 4)	Regulatory documents for research methods
Odor under 20°	0	- 2	points	GOST R 57164-16
Odor under 60°	0	2	points	GOST R 57164-16
Off-flavor	0	2	points	GOST R 57164-16
Turbidity	1.37 ± 0.27	1.5 (2.0)	mg/dm <sup>3</sup>	GOST R 57164-16 (wavelength - 530 nm)
Colour	13.4 ± 2.7	20 (35)	degrees	GOST 31868-12
pH	7.34 ± 0.20	6.5-8.5		Federal Environmental Regulation 14.1:2:3:4.121-04
Ammonia (by nitrogen)	0.12 ± 0.02	2.0	mg/dm <sup>3</sup>	
Nitrite ion	0.0050 ± 0.0025	3.0	mg/dm <sup>3</sup>	
Nitrates	1.69 ± 0.34	45.0	mg/dm <sup>3</sup>	GOST 33045-14
Total hardness	2.85 ± 0.43	7.0	mg-eq/dm <sup>3</sup> (°h)	GOST 31954-12
Dry residue (total dissolved solids)	244.0 ± 22.0	1000.0	mg/dm <sup>3</sup>	Federal Environmental Regulation 14.1:2:4.114-97
Chlorides	31.24 ± 4.69	350.0	mg/dm <sup>3</sup>	GOST 4245-72"
Sulphates	52.42 ± 5.24	520.0	mg/dm <sup>3</sup>	GOST 4389-72
Ferrum	0.14 ± 0.04	0.3	mg/dm <sup>3</sup>	GOST 4011-72
Fluorine	0.09 ± 0.01	1.5 (1.2)	mg/dm <sup>3</sup>	GOST 4386-89
Oil products	0.011 ± 0.004	0.1	mg/dm <sup>3</sup>	Federal Environmental Regulation 14.1:2:4.128-98
Phenol	0.00070 ± 0.00025	0.001	mg/dm <sup>3</sup>	Federal Environmental Regulation 14.1:2:4.182-02
Anionic surface active agents	less than 0.025	0.5-	mg/dm <sup>3</sup>	Federal Environmental Regulation 14.1:2:4.158-2000
Zinc	0.0220 ± 0.0066	5.0	mg/dm <sup>3</sup>	
Cadmium	0.00057 ± 0.00017	0.001	mg/dm <sup>3</sup>	
Lead	0.006 ± 0.0018	0.03	mg/dm <sup>3</sup>	Methodological Instructions 31-03/04
Copper	less than 0.005	1.0	mg/dm <sup>3</sup>	GOST 31866-12
Arsenic	less than 0.001	0.05	mg/dm <sup>3</sup>	Methodological Instructions 31-09/04 GOST 31866-12
Mercury	less than 0.00001	0.0005	mg/dm <sup>3</sup>	Guidelines 2865-04
Manganese	0.014 ± 0.004	0.1	mg/dm <sup>3</sup>	Federal Environmental Regulation 14.1:2:4.188-02
Aluminium	0.018 ± 0.006	0.5	mg/dm <sup>3</sup>	GOST 18165-14

ного тест-штамма – *Micrococcus luteus* (штамм № 2665 ГИСК им. Л.А. Тарасевича) [22].

3. Определение способности микроорганизмов противостоять бактерицидному действию сыворотки крови человека проводили на основании стандартных методик с использованием свежих стерильных сывороток [23].

4. Антииммуноглобулиновая активность бактерий определялась методом, основанным на радиальной иммунодиффузии в геле (по Манчини), с использованием и в соответствии с «Инструкцией по применению сывороток диагностических моноспецифических против IgG человека сухих» от 27.01.1995 г. Для этого каждую из исследуемых и опытных культур клебсиелл выращивали на плотной питательной среде, из выросшей агаровой культуры готовили микробную взвесь в физиологическом растворе, которую затем стандартизировали на ФЭК-М до плотности, соответствующей 0,5. Далее 0,1 мл взвеси вносили в пробирку с 0,1 мл сыворотки крови человека, содержащей известное количество IgG, параллельно готовили контроль из физиологического раствора и сыворотки крови. Опыт и контроль инкубировали 30 мин, затем получали супернатант и определяли в нём методом радиальной иммунодиффузии остаточную концентрацию иммуноглобулинов. По разнице концентраций иммуноглобулина в контрольной и опытной пробах делали вывод об антииммуноглобулиновой активности микроорганизмов [22].

5. Адгезия бактерий проводилась развёрнутым (пробирочным) методом на эритроцитах человека 0 (I) группы, Rh+ и оценивалась по следующим критериям [24]:

- СПА (средний показатель адгезии) – среднее количество микробов, адгезированных на одном эритроците;
- К (коэффициент участия эритроцитов в адгезивном процессе) – процент эритроцитов, имеющих на своей поверхности адгезированные микробы;
- ИАМ (индекс адгезивности микроорганизма) – среднее количество микробных клеток на одном, участвующем в адгезивном процессе эритроците, вычисляется по формуле  $ИАМ = СПА \cdot 100 / К$ . Принято считать, что если  $ИАМ \leq 1,75$ , то бактерии не обладают адгезивной активностью.

В качестве буфера был использован 0,1 М раствор фосфата натрия, приготовленный на изотоническом растворе хлорида натрия (рН 7,2–7,3).

Взвесь микробов использовалась в концентрации  $10^9$  кл/мл. Для этого культуру с плотной питательной среды (МПА) промывали дважды раствором буфера путём центрифугирования (1000 об./мин), затем в буферном растворе готовили взвесь заданной концентрации.

Эритроциты предварительно также дважды отмывали буферным раствором путём центрифугирования (1000 об./мин). После чего с использованием буфера готовили взвесь эритроцитов 100 млн/мл.

В пробирку вносили по 0,5 мл взвеси микробов и эритроцитов. Смесь инкубировали при 37 °С на встряхивателе 30 мин. Готовили мазок на стекле, который высушивали при комнатной температуре, фиксировали метанолом, после чего окрашивали по Граму.

Подсчёт проводился на 50 эритроцитах, просматривалось всё предметное стекло.

6. Определение чувствительности бактерий к лактоферрину (ЛФ), спермину и спермидину проводили с использованием лактоферрина, а также солянокислых спермина и спермидина фирмы «Fluka». Различия в определении чувствительности бактерий к лактоферрину, спермину и спермидину заключаются в том, что в опытные пробирки добавляли разные вещества [4, 25].

7. Определение способности бактерий к продукции белка, иммунохимически сходного с лактоферрином человека (БЛФ), основывается на реакции ИФА с применением стандартных наборов фирмы «НВТ».

3. The ability of microorganisms to resist a bactericidal effect of human blood serum was determined on the basis of standard methods with the use of fresh sterile sera [22].

4. Anti-Ig activity of *Klebsiella* was identified with the method of gel radial immunodiffusion with Mancini method with the use of and according to the “Guidelines on Application of Dry Diagnostic Monospecific Serum against Human Ig G” dated 27.10.95. For this purpose, each of the examined and tested cultures of *Klebsiella* was grown in a dense nutrient medium, then the grown agar culture was used to prepare a microbial suspension in the physiological solution which was further standardized on the photoelectric colorimeter M to the density, corresponding to 0.5. Then 0.1 ml of the suspension was put into a tube with 0.1 ml of human blood serum, containing a known quantity of IgG; at the same period of time, the physiological solution and blood serum were used to prepare a control sample. The experimental and control samples were incubated during 30 minutes, then a supernatant was obtained and used for determining trough concentration of immunoglobulins with the radial immunodiffusion method. Difference between the concentration of immunoglobulin in the control and experimental samples allowed to draw a conclusion on anti-Ig activity of the microorganisms [22].

5. Bacterial adhesion was carried out with a detailed (test tube) method on human erythrocytes, 0 (I) group, Rh+, and was assessed by the following criteria:

- adhesion mean value (AML) – an average number of microbes, adhered on one erythrocyte.
- coefficient of participation of erythrocytes in the adhesion process (C) – percentage of erythrocytes with adhered microbes on their surface.
- microbial adhesion index (MAI) – an average number of microbial cells on one erythrocyte that participates in the adhesion process; the index is calculated by the formula  $MAI = AML \cdot 100 / K$ . It is generally believed that bacteria have no adhesion activity if  $MAI \leq 1.75$ .

0.1 mol solution of sodium phosphate, prepared on an isotonic solution of sodium chloride (pH 7.2–7.3), was used as a buffer.

The microbial suspension was used in the concentration of  $10^9$  c/ml. For that purpose, the culture from a solid nutrient medium (MIA) was washed twice with the buffer solution through centrifugation (1,000 r/min), then a solution of the specified concentration was prepared in the buffer solution.

The erythrocytes were also pre-washed twice with the buffer solution through centrifugation (1,000 r/min). Then a solution of the erythrocytes of 100 million/ml was prepared in the buffer solution.

0.5 ml of the microbial suspension and the same amount of erythrocytes were added into a tube. The mixture was incubated on a shaker under the temperature of 37° C during 30 minutes. Then a smear was prepared on a slide, was dried at room temperature, fixed with methanol and stained according to Gram’s method.

The count was conducted on 50 erythrocytes with the examination of the whole slide.

6. Sensitivity of the bacteria to lactoferrin (LF), spermine and spermidine was determined with the use of lactoferrin and muriatic spermine and spermidine, produced by Fluka company. Differences in determining the bacterial sensitivity to lactoferrin, spermine and spermidine were in adding different substances to the test tubes [4, 25].

7. The ability of bacteria to produce protein that is immunologically similar to human lactoferrin was determined on the basis of EIA reaction with the use of standard kits of NBT company.

Воздействие поллютантов на биохимические свойства микроорганизмов ( $M \pm m$ )

Поллютанты	БАС, усл. ед.	РНКаза, мг/мл	АнтиIgG, мг/мл	Липаза, усл. ед.	Показатель адгезии			Синтез белка, иммунохимиче- ски сходного с лактоферрином человека, нг/мл	Устойчи- вость к ЛФ, %	ЛА, мкг/мл	АЛА, мкг/мл
					СПА	К	ИАМ				
Диэтаноламин, <i>n</i> = 150	3,969 ± 0,08	1,174 ± 0,07	6,6 ± 0,5	0,5 ± 0,01	2,4 ± 0,5	98 ± 3	2,4 ± 0,5	17,967 ± 0,4	97,5 ± 8,0	2,709 ± 0,02	2,412 ± 0,05
Фенол, <i>n</i> = 150	3,109 ± 0,07	1,167 ± 0,05	7,0 ± 0,4	0,08 ± 0,01	2,8 ± 0,4	98 ± 3	2,9 ± 0,5	16,426 ± 0,4	95,5 ± 8,1	1,90 ± 0,01	5,153 ± 0,05
Серная кислота, <i>n</i> = 150	1,989 ± 0,07	1,186 ± 0,04	6,9 ± 0,4	2,97 ± 0,08	2,2 ± 0,4	94 ± 3	2,3 ± 0,3	15,471 ± 0,3	92,5 ± 8,1	0,009 ± 0,0003	3,53 ± 0,05
Азотная кислота, <i>n</i> = 150	1,692 ± 0,06	1,188 ± 0,04	5,4 ± 0,3	0,33 ± 0,08	2,5 ± 0,4	97 ± 3	2,6 ± 0,3	18,013 ± 0,7	94,5 ± 8,1	2,226 ± 0,05	3,483 ± 0,05
Контроль, <i>n</i> = 150	0,849 ± 0,05	0,688 ± 0,05	4,8 ± 0,2	1,6 ± 0,03	1,3 ± 0,2	81 ± 2	1,6 ± 0,2	10,704 ± 0,2	63,6 ± 7,3	1,050 ± 0,03	0,204 ± 0,01

8. Изучение способности бактерий к разложению нуклеиновой кислоты (РНКазная активность) проводилось собственной модификацией общепринятого метода (Рац. предложение № 1204 от 18.05.1999 г. «Фотометрический способ определения нуклеазной активности бактерий») [26].

Для анализа полученных результатов исследования применялись методы статистической обработки, а именно: для каждой выборки вычислялись показатели описательной статистики: количество наблюдений в исходной выборке (*n*), среднее арифметическое полученных значений (*M*), среднее квадратическое отклонение (*m*), стандартная ошибка среднего арифметического, минимальное (*min*) и максимальное (*max*) значение изучаемого признака. Вид распределения количественных данных анализировался с помощью критерия Шапиро–Уилка. После оценки соответствия нормальному закону распределения проводился выбор метода статистического анализа. В связи с тем, что распределение количественных переменных в нашей работе было нормальным, был выбран параметрический метод анализа. Центральные тенденции и рассеяния признаков описаны с помощью среднего значения (*M*) и среднего квадратического отклонения (*m*). Доверительные интервалы рассчитывались для вероятности *p* = 95%. Различия между сравниваемыми параметрами считали статистически значимыми при *p* < 0,05. Для расчёта статистической значимости различий в двух связанных группах использовался *t*-критерий Стьюдента. Статистический анализ результатов проведён с использованием статистических программ Microsoft Excel и Statistica for Windows.

## Результаты

Полученные нами результаты, описывающие воздействие поллютантов на биохимический профиль бактерий, представлены в табл. 2.

8. The ability of bacteria to decompose sodium nucleinate (RNAase activity) was studied with the use of our own modification of the general method (Improvement Suggestion No. 1204 “Photometric Method for Determining Nuclease Activity of Bacteria” dated 18.05.1999) [26].

The following methods of statistical processing were used to analyze the obtained results: descriptive statistics indices were calculated for each sample, viz. the number of observations in the initial sample (*n*), the arithmetic mean of the obtained values (*M*), the mean square deviation (*m*), the standard error of the mean (*t*), the minimum (*min*) and maximum (*max*) values of the examined indicator. The type of quantitative data distribution was analyzed with the Shapiro-Wilk test. The evaluation of conformity with the normal law of distribution was followed by the choice of the method for statistical analysis. The fact of normal distribution of quantitative variables in the paper resulted in choosing the parametric method of analysis. Central tendencies and scattering of the characters were described with the use of the mean value (*M*) and the mean square deviation (*m*). Confidence intervals were calculated for probability *p*=95%. Differences between the compared parameters were considered statistically significant if *p* < 0.05. Student's *t*-test was used to calculate statistical significance of differences in two related groups. The results were statistically analyzed with Microsoft Excel and Statistica for Windows programs.

## Results

The obtained results, describing the effect of pollutants on biochemical profile of the bacteria, are presented in the Table 2.

Table 2

Effect of pollutants on biochemical properties of microorganisms ( $M \pm m$ )

Pollutants	SBA, arb. unit.	RNAase, mg/ml	Anti-Ig, mg/ml	Lipase, arb. unit.	Adhesion			Synthesis of protein that is immunochemically similar to human lactoferrin, ng/ml	Resistance to LF, %	LA, µg/ml	ALA, µg/ml
					AML	C	MAI				
Diethanolamine, <i>n</i> =150	3.969 ± 0.08	1.174 ± 0.07	6.6 ± 0.5	0.5 ± 0.01	2.4 ± 0.5	98 ± 3	2.4 ± 0.5	17.967 ± 0.4	97.5 ± 8.0	2.709 ± 0.02	2.412 ± 0.05
Phenol, <i>n</i> =150	3.109 ± 0.07	1.167 ± 0.05	7.0 ± 0.4	0.08 ± 0.01	2.8 ± 0.4	98 ± 3	2.9 ± 0.5	16.426 ± 0.4	95.5 ± 8.1	1.90 ± 0.01	5.153 ± 0.05
Sulfuric acid, <i>n</i> =150	1.989 ± 0.07	1.186 ± 0.04	6.9 ± 0.4	2.97 ± 0.08	2.2 ± 0.4	94 ± 3	2.3 ± 0.3	15.471 ± 0.3	92.5 ± 8.1	0.009 ± 0.0003	3.483 ± 0.05
Nitric acid, <i>n</i> =150	1.692 ± 0.06	1.188 ± 0.04	5.4 ± 0.3	0.33 ± 0.08	2.5 ± 0.4	97 ± 3	2.6 ± 0.3	18.013 ± 0.7	94.5 ± 8.1	2.226 ± 0.05	3.483 ± 0.05
Control, <i>n</i> =150	0.849 ± 0.05	0.688 ± 0.05	4.8 ± 0.2	1.6 ± 0.03	1.3 ± 0.2	81 ± 2	1.6 ± 0.2	10.704 ± 0.2	63.6 ± 7.3	1.050 ± 0.03	0.204 ± 0.01

В ходе проведённого эксперимента было установлено, что бактерии, прошедшие предварительную инкубацию с ДЭА, по своим свойствам существенно отличаются от контрольных вариантов. Различия были выявлены при сравнении проявлений антилизоцимной активности микроорганизмов ( $p = 0,00091$ ), индекса адгезии микроорганизмов, коэффициента адгезии и среднего показателя адгезии ( $p = 0,0087$ ), РНКазной ( $p = 0,0047$ ), липазной ( $p = 0,0465$ ), антииммуноглобулиновой (IgG) активностей ( $p = 0,048$ ), а также способности штаммов клебсиелл, прошедших инкубацию, к преодолению бактерицидной активности сыворотки (БАС) ( $p = 0,0491$ ). Способность самих бактерий синтезировать белок, иммунохимически сходный с лактоферрином человека, в опытной группе также выше по сравнению с контрольной ( $p = 0,0492$ ), как и устойчивость клебсиелл к воздействию ЛФ в опытной группе ( $p = 0,0477$ ).

Исследование влияния, оказанного раствором фенола на бактериальную клетку, показало, что липазная активность существенно снизилась: достоверность различий составляет ( $p = 0,0008$ ). РНКазная активность культур после контакта с фенолом, напротив, повысилась ( $p = 0,031$ ). Также возросла и способность клебсиелл противостоять бактерицидной активности сыворотки и их антииммуноглобулиновая активность ( $p = 0,035$  и  $p = 0,039$  соответственно). Адгезивная активность также возросла по всем параметрам ( $p = 0,042$ ). Продукция лизоцима бактериями из опытной группы различалась с контрольной ( $p = 0,047$ ), антилизоцимной активностью опытные варианты обладали также в большей степени ( $p = 0,0001$ ). Аналогичные изменения выявлены и в отношении к синтезу бактериями белка, иммунохимически сходного с лактоферрином человека, и устойчивостью бактерий к ЛФ. Опытные варианты производили больше белка, иммунохимически сходного с лактоферрином человека ( $p = 0,028$ ), они же были устойчивее к ЛФ по сравнению с контрольными ( $p = 0,025$ ).

Влияние, оказываемое растворами азотной и серной кислот на клебсиеллы, выглядит следующим образом: липазная активность снизилась в опыте с азотной кислотой ( $p = 0,005$ ) и повысилась в опыте с серной ( $p = 0,048$ ). Установление различий показало, что РНКазная активность культур после контакта с раствором серной кислоты также существенно повысилась ( $p = 0,0056$ ). РНКазная активность клебсиелл после контакта с раствором азотной кислоты имела ту же направленность ( $p = 0,0059$ ). Возросла способность клебсиелл противостоять бактерицидной активности сыворотки крови после контакта с раствором серной кислотой ( $p = 0,029$ ), как и после контакта с раствором азотной кислоты ( $p = 0,0334$ ). Также было зафиксировано изменение в антииммуноглобулиновой активности клебсиелл после контакта с растворами кислот: применительно к азотной кислоте  $p = 0,050$ , серной кислоте  $p = 0,045$ . Адгезивная активность микроорганизмов также возросла после инкубации с раствором азотной кислоты ( $p = 0,049$ ), как и с раствором серной кислоты ( $p = 0,0389$ ). Продукция лизоцима бактериями из обеих опытных групп различалась с контрольной:  $p = 0,00029$  в опыте с использованием серной кислоты и  $p = 0,009$  в опыте с использованием азотной кислоты. Антилизоцимной активностью опытные варианты обладали в значительно большей степени:  $p = 0,0089$  в опыте с азотной и  $p = 0,008$  в опыте с серной кислотами. Точно так же опытные варианты продуцировали больше белка, иммунохимически сходного с лактоферрином человека:  $p = 0,045$  в группе бактерий, прошедших предварительную инкубацию с раствором серной кислоты;  $p = 0,0491$  в группе бактерий, прошедших инкубацию с раствором азотной кислоты. Эти же штаммы демонстрировали большую устойчивость к ЛФ по сравнению с контрольными:  $p = 0,046$  и  $p = 0,0472$  для растворов серной и азотной кислот соответственно.

The experiment allowed to identify that the bacteria, preliminarily incubated with DEA, differed significantly from the control group by their properties. Differences were revealed during the comparison of displays of anti-lysozyme activity of the microorganisms ( $p=0.00091$ ), microbial adhesion index, adhesion coefficient and adhesion mean value ( $p=0.0087$ ), RNAase ( $p = 0.0047$ ), lipase ( $p=0.0465$ ) and anti-Ig ( $p=0.048$ ) activities, as well as the ability of incubated *Klebsiella* strains to cope with serum bactericidal activity (SBA) ( $p=0.0491$ ). The ability of bacteria to synthesize protein that is immunochemically similar to human lactoferrin is higher in the experimental group in comparison with the control group ( $p=0.0492$ ), as well as *Klebsiella* resistance to the effect of lactoferrin in the experimental group ( $p=0.0477$ ).

A study on the effect of phenol on a bacterial cell showed that the lipase activity decreased significantly: the statistical significance is ( $p=0,0008$ ). On the contrary, the RNAase activity increased after the contact with phenol ( $p=0,031$ ). The ability of *Klebsiella* to resist serum bactericidal activity and their anti-Ig activity increased as well ( $p=0.035$  and  $p=0.039$  respectively). The adhesion activity also increased by all parameters ( $p=0.042$ ). Lysozyme production by bacteria from the experimental group differed from the control group ( $p=0.047$ ), and experimental samples also demonstrated their anti-lysozyme activity in a greater degree ( $p=0.0001$ ). Similar changes also were revealed in relation to the synthesis of protein that is immunochemically similar to human lactoferrin and bacterial resistance to lactoferrin. The experimental samples produced more protein that is immunochemically similar to human lactoferrin ( $p=0.028$ ), they were also more resistant to LF than the control samples ( $p=0.025$ ).

The effect of sulfuric and nitric acids on *Klebsiella* is as follows: the lipase activity decreased in the experiment with nitric acid ( $p=0.005$ ) and increased in the experiment with sulfuric acid ( $p=0.048$ ). The identified differences indicated that the RNAase activity of cultures after the contact with the sulfuric acid solution also increased significantly ( $p=0.0056$ ). The RNAase activity of *Klebsiella* after the contact with the nitric acid solution had the same tendency ( $p=0.0059$ ). The ability of *Klebsiella* to resist blood serum bactericidal activity increased after the contact with the sulfuric acid solution ( $p=0.029$ ) and with the nitric acid solution ( $p=0.0334$ ). *Klebsiella* anti-Ig activity also changed after the contact with the acid solutions –  $p=0.050$  for nitric acid and  $p=0.045$  for sulfuric acid. The adhesion activity increased after its incubation both with the nitric acid solution ( $p=0.049$ ) and with the sulfuric acid solution ( $p=0.0389$ ) as well. Lysozyme production by bacteria from both experimental groups differed from the control group –  $p=0.00029$  in the experiment with sulfuric acid and  $p=0.009$  in the experiment with nitric acid. The experimental samples demonstrated their anti-lysozyme activity in a greater degree –  $p=0.0089$  in the experiment with nitric acid and  $p=0.008$  in the experiment with sulfuric acid. Similarly, the experimental samples produced more protein that is immunochemically similar to human lactoferrin –  $p=0.045$  in the group of bacteria that were pre-incubated with the sulfuric acid solution and  $p=0.0491$  in the group of bacteria that were pre-incubated with the nitric acid solution. The same strains were also more resistant to LF in comparison with the control samples –  $p=0.046$  and  $p=0.0472$  for the solutions of sulfuric and nitric acids respectively.



## Обсуждение

Полученные результаты, как нам представляется, можно интерпретировать следующим образом.

Вполне вероятно, что соединения, образующиеся в воде после добавления азотной кислоты, являются ещё одним дополнительным источником азота для бактерий. Это в свою очередь оказывает стимулирующее действие на весь метаболизм клетки, в том числе и на синтез веществ, благодаря которым бактерии реализуют свои патогенные свойства. В то же время другие использованные нами соединения в качестве питательных веществ не могут выступать по определению. Диэтаноламин – вещество абсолютно производственное и аналогов в природе не имеет. Он широко применяется в качестве адсорбента углекислого газа и сероводорода в нефтегазодобывающей отрасли и некоторых других областях промышленности. В настоящее время имеются лишь фрагментарные данные о его негативном влиянии на теплокровных животных и рыб. Выявленные нами изменения биохимических свойств бактерий представляют достаточный интерес, так как диэтаноламин, поступающий в составе сточных вод промышленных предприятий при технологических и аварийных утечках в водоёмы, способен, очевидно, изменять биологический профиль уже имеющихся там микроорганизмов, в том числе и в неблагоприятную для человека сторону [27–29]. Соединения, возникающие после попадания серной кислоты в воду, бесспорно, встречаются в природе. Серная кислота – компонент кислотных дождей, которая, как было установлено в ходе настоящего исследования, попадая в крайне динамичную в химическом плане водную среду, может, как и диэтаноламин, приводить к неоднозначным для человека последствиям. Полученные нами результаты показывают также, что вещества, вызывающие наибольшее подавление жизнедеятельности микроорганизмов, могут вызывать в них изменения, не предполагаемые ранее. В проведённом исследовании раствор фенола, известный как карболовая кислота и сильный антисептик, взятый на уровне ПДК, действовал в некотором роде по принципу «всё или ничего», так как именно фенол по сравнению с другими ксенобиотиками вызывал наибольший рост такого важного фактора патогенности микроорганизмов, как их антилизоцимная активность.

## Заключение

Таким образом, во всех наших опытах после контакта с поллютантами было установлено повышение патогенных свойств клебсиелл. Эти изменения, очевидно, имеют адаптивную природу, а их механизм состоит в селекции из гетерогенной бактериальной популяции отдельных вариантов, наиболее устойчивых к любым неблагоприятным воздействиям. Согласно теории адаптивного полиморфизма патогенных микроорганизмов, возбудители, способные к обитанию в различных условиях внешней среды (к этой категории относятся и клебсиеллы, задействованные в нашей работе), обладают значительно большим потенциалом изменчивости, чем облигатные паразиты, занимающие узкие экологические ниши, а высокая экологическая пластичность грамотрицательных потенциально патогенных бактерий позволяет им легко адаптироваться к качественно различным условиям существования [5, 7, 8, 13, 30]. Именно поэтому в природных местообитаниях, претерпевших трансформацию под воздействием поллютантов, могут формироваться высоковирулентные варианты достаточно безобидных потенциально патогенных бактерий, широко распространённых в природе.

С этой позиции предпринятая нами попытка разработки новых методических подходов оценки антропогенного влияния на внешнюю среду на примере анализа факторов патогенности микроорганизмов, изолируемых из загрязнённой поллютантами воды, позволяет оценить как опасность распространения заболеваний бактериальной этиологии, так и детально представить интенсивность и направленность влияния на этот процесс конкретных ксенобиотиков.

## Discussion

From our point of view, the obtained results can be interpreted as follows. Compounds that are formed in water when nitric acid is added are likely to be one more source of nitrogen for bacteria. In its turn, it has a stimulating effect on the whole metabolism of a cell, including on the synthesis of substances that help bacteria actualize their pathogenic properties. At the same time, other compounds, used by us, cannot be nutrients by definition. Diethanolamine is a totally industrial substance and has no analogues in nature. It is widely used in oil-and-gas and other industries as an absorber of carbon dioxide and hydrogen sulfide. Nowadays, there are only fragmentary data on its negative impact on warm-blooded animals and fish. Changes of bacterial biochemical properties that were identified by us are of sufficient interest, because diethanolamine, being released with industrial wastewater into waterbodies in case of technological and emergency leaks, may change the biological profile of inhabiting microorganisms, which also may be unfavourable for humans [27–29]. Compounds that appear when sulfuric acid is released into water indeed are found in nature. Sulfuric acid is a component of acid rains which (as it was identified during the present study), appearing in an extremely dynamic (in terms of chemistry) water medium, may lead – like diethanolamine does – to ambiguous consequences for humans.

The obtained results also show that substances that suppress vital activity of microorganisms most of all can cause changes in them that have not been supposed before. In the conducted study, the solution of phenol, known as carbolic acid and strong antiseptic, taken at TLV level, acts, to some extent, by the principle “all or nothing”, as it was the phenol that caused the maximum increase (in comparison with other xenobiotics) in such an important factor of microorganism pathogenicity as anti-lysozyme activity.

## Conclusion

Therefore, all our experiments identified an increase in *Klebsiella* pathogenic properties after the contact with pollutants. These changes are likely to have adaptive nature, and their mechanism consists in selection of certain specimens, that are the most resistant to any unfavourable conditions, from a heterogeneous bacterial population. According to the theory of adaptive polymorphism of pathogenic microorganisms, agents that can live in different environmental conditions (including *Klebsiella*, used in our study) have much greater potential of changeability than obligate parasites, occupying narrow ecological niches, and a high environmental flexibility of gram-negative and potentially pathogenic bacteria allow them to adapt easily to qualitatively different conditions of existence [5, 7, 8, 13, 30]. That is why these are natural habitats, transformed under a pollutant effect, where highly-virulent variants of quite harmless but potentially pathogenic bacteria, widely spread in nature, can appear.

From this line of reasoning, our attempt to develop new methodological approaches to assessment of the anthropogenic effect on the environment on the example of the analysis of pathogenicity factors of microorganisms, isolated from pollutant-contaminated water, allows both to assess the risk of spreading diseases of bacterial etiology and to present in detail the intensity and type of influence of specific xenobiotics on this process.

## Литература

## References

- Тришина А.В., Березняк Е.А., Сильнова И.Р., Веркина Л.М. Биоразнообразие и антибиотикорезистентность условно патогенных энтеробактерий, выделенных из поверхностных водоёмов Ростова-на-Дону. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 4: 17–23.
- Зарицкая Е.В., Полозова Е.В., Богачева А.С. Современные альтернативные токсикологические методы исследования и перспективы их использования в практической деятельности. *Гигиена и санитария*. 2017; 96 (7): 671–4.
- Ракитский В.Н., Юдина Т.В., Егорова М.В., Кутакова Н.С. Неинвазивные методы исследования влияния выбросов предприятий цветной металлургии на здоровье человека. *Гигиена и санитария*. 2017; 96 (12): 1192–5.
- Бойко О.В., Терентьев А.А., Николаев А.А., Чомаев А.М. *Молекулярные механизмы персистирующей инфекции*. Астрахань: Издательский дом «Астраханский университет»; 2006. 112 с.
- Бухарин О.В., Литвин В.Ю. *Патогенные бактерии в природных экосистемах*. Екатеринбург: УрО РАН; 1997. 275 с.
- Рахманин Ю.А., Иванова Л.В., Артемова Т.З., Загайнова А.В., Гипп Е.К., Недачин А.В. и соавт. Жизнедеятельность микроорганизмов и паразитарных патогенов в условиях химического загрязнения воды поверхностных водоёмов. *Гигиена и санитария*. 2017; 96 (10): 956–60.
- Ostrem Loss E.M., Yu J.H. Bioremediation and microbial metabolism of benzo(a)pyrene. *Mol Microbiol*. 2018; 109 (4): 433–44.
- Dunivin T.K., Miller J., Shade A. Taxonomically-linked growth phenotypes during arsenic stress among arsenic resistant bacteria isolated from soils overlying the Centralia coal seam fire. *PLoS One*. 2018; 13 (1): e0191893.
- Koutinas M., Vasquez M.I., Nicolaou E., Pashali P., Kyriakou E., Loizou E. et al. Biodegradation and toxicity of emerging contaminants: Isolation of an exopolysaccharide-producing *Sphingomonas* sp. for ionic liquids bioremediation. *J Hazard Mater*. 2018; 365: 88–96.
- Kuris A.M., Lafferty K.D., Sokolow S.H. Saprosonis: a distinctive type of infectious agent. *Trends Parasitol*. 2014; 30 (8): 386–93.
- Truitt L.N., Vazquez K.M., Pfuntner R.C., Rideout S.L., Havelaar A.H., Strawn L.K. Microbial Quality of Agricultural Water Used in Produce Preharvest Production on the Eastern Shore of Virginia. *J Food Prot*. 2018; 81 (10): 1661–72.
- Sohn W.M., Na B.K., Cho S.H., Ju J.W., Kim C.H., Yoon K.B. et al. Infections with *Centrocestus armatus* Metacercariae in Fishes from Water Systems of Major Rivers in Republic of Korea. *Korean J Parasitol*. 2018; 56 (4): 341–9.
- Teodoro A., Júnior A.M., Boncz M.Á., Paulo P.L. Alternative use of *Pseudomonas aeruginosa* as indicator for greywater disinfection. *Water Sci Technol*. 2018; 78 (6): 1361–9.
- Бойко О.В., Ахминеева А.Х., Гудинская Н.И. и соавт. Биохимические и иммунологические маркеры в диагностике патологических состояний. *Фундаментальные исследования*. 2013; 9: 327–9.
- Коленчукова О.А., Савченко А.А. Состояние иммунного статуса и нормальной микрофлоры зева у лиц, проживающих в районе техногенного загрязнения. *Гигиена и санитария*. 2006; 6: 8–11.
- Сомов Г.П., Литвин В.Ю. *Сапрофитизм и паразитизм патогенных бактерий*. Новосибирск: Наука; 1988. 208 с.
- Бойко О.В., Терентьев А.А., Бойко В.И. Молекулярные механизмы бактерионосительства (характеристика и подробный анализ). Saarbrücken: Palmarium academic publishing; 2012. 175 с.
- Aljadi S.H., Al-Shemmari M., Al-Ramzi J., Al-Abdullatif S., Hajayah Z., Jamal L. et al. Bacterial contamination in physical therapy departments in the State of Kuwait. *J Phys Ther Sci*. 2017; 29 (6): 1014–8.
- Grami D., Rtibi K., Selmi S., Jridi M., Sebai H., Marzouki L. et al. Aqueous extract of *Eruca Sativa* protects human spermatozoa from mitochondrial failure due to bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol*. 2018; 82: 103–10.
- Kong Q., He X., Feng Y., Miao M.S., Wang Q., Du Y.D. et al. Pollutant removal and microorganism evolution of activated sludge under ofloxacin selection pressure. *Bioresour Technol*. 2017; 241: 849–56.
- Бойко О.В., Ахминеева А.Х., Гудинская Н.И., Бойко В.И., Козак Д.М. Возрастные изменения иммунологических, морфологических и биохимических показателей репродуктивной системы мужчин. *Успехи геронтологии*. 2014; 27 (1): 50–3.
- Бухарин О.В., Усвятсов Б.Я. *Бактерионосительство (медико-экологический аспект)*. Екатеринбург; 1996. 206 с.
- Бухарин О.В., Созыккин В.Л. *Факторы естественного иммунитета*. Оренбург; 1979. 73 с.
- Биргер М.О. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования*. М.: Медицина; 1982. 462 с.
- Бойко О.В., Николаев А.А., Плосконос М.В. Идентификация резидентного бактерионосительства в урологии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2004; 9: 32–3.
- Касыров Л.Б. *Экспериментальная микробиология*. София: Медицина и физкультура; 1965. 486 с.
- Галиулин Р.В., Галиулина Р.А., Башкин В.Н. Геоэкология метанола, используемого в газовой промышленности. *Деловой журнал Neftegaz. RU*. 2017; 2: 84–9.
- Trishina A.V., Bereznyak E.A., Sil'nova I.R., Verkina L.M. Biodiversity and antibiotic susceptibility of opportunistic enterobacteria isolated from surface water bodies of Rostov-on-Don. *Russian mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; 4: 17–23. (in Russian)
- Zarickaya E.V., Polozova E.V., Bogacheva A.S. Modern alternative toxicological research methods and prospects for their use in practice. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2017; 96 (7): 671–4. (in Russian)
- Rakitskiy V.N., Yudina T.V., Yegorova M.V., Kutakova N.S. Non-invasive methods for studying the effect of emissions from non-ferrous metallurgy enterprises on human health. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2017; 96 (12): 1192–5. (in Russian)
- Boiko O.V., Terent'ev A.A., Nikolaev A.A., Chomaev A.M. *Molecular mechanisms of persistent infection [Molekulyarnyye mekhanizmy persistiruyushchey infektsii]*. Astrakhan': Izdatel'skiy dom «Astrakhanskiy universitet»; 2006. 112 p. (in Russian)
- Buharin O.V., Litvin V.Yu. *Pathogenic bacteria in natural ecosystems [Patogennyye bakterii v prirodnykh ekosistemakh]*. Ekaterinburg: UrO RAN; 1997. 275 p. (in Russian)
- Rahmanin Yu.A., Ivanova L.V., Artemova T.Z., Zagajnova A.V., Gipp E.K., Nedachin A.V. et al. The vital activity of microorganisms and parasitic pathogens in the conditions of chemical pollution of surface water. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2017; 96 (10): 956–60. (in Russian)
- Ostrem Loss E.M., Yu J.H. Bioremediation and microbial metabolism of benzo(a)pyrene. *Mol Microbiol*. 2018; 109 (4): 433–44.
- Dunivin T.K., Miller J., Shade A. Taxonomically-linked growth phenotypes during arsenic stress among arsenic resistant bacteria isolated from soils overlying the Centralia coal seam fire. *PLoS One*. 2018; 13 (1): e0191893.
- Koutinas M., Vasquez M.I., Nicolaou E., Pashali P., Kyriakou E., Loizou E. et al. Biodegradation and toxicity of emerging contaminants: Isolation of an exopolysaccharide-producing *Sphingomonas* sp. for ionic liquids bioremediation. *J Hazard Mater*. 2018; 365: 88–96.
- Kuris A.M., Lafferty K.D., Sokolow S.H. Saprosonis: a distinctive type of infectious agent. *Trends Parasitol*. 2014; 30 (8): 386–93.
- Truitt L.N., Vazquez K.M., Pfuntner R.C., Rideout S.L., Havelaar A.H., Strawn L.K. Microbial Quality of Agricultural Water Used in Produce Preharvest Production on the Eastern Shore of Virginia. *J Food Prot*. 2018; 81 (10): 1661–72.
- Sohn W.M., Na B.K., Cho S.H., Ju J.W., Kim C.H., Yoon K.B. et al. Infections with *Centrocestus armatus* Metacercariae in Fishes from Water Systems of Major Rivers in Republic of Korea. *Korean J Parasitol*. 2018; 56 (4): 341–9.
- Teodoro A., Júnior A.M., Boncz M.Á., Paulo P.L. Alternative use of *Pseudomonas aeruginosa* as indicator for greywater disinfection. *Water Sci Technol*. 2018; 78 (6): 1361–9.
- Boiko O.V., Ahmineeva A.Kh., Gudinskaya N.I. et al. Biochemical and immunological markers in the diagnosis of pathological conditions. *Fundamental'nyye issledovaniya*. 2013; 9: 327–9. (in Russian)
- Kolenchukova O.A., Savchenko A.A. The state of the immune status and normal microflora of the pharynx in persons living in the area of industrial pollution. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2006; 6: 8–11. (in Russian)
- Somov G.P., Litvin V.Yu. *Saprophyticism and parasitism of pathogenic bacteria [Saprofitizm i parazitizm patogennykh bakteriy]*. Novosibirsk: Nauka; 1988. 208 p. (in Russian)
- Boiko O.V., Terent'ev A.A., Boiko V.I. *Molecular mechanisms of bacteriocarrier (characterization and detailed analysis) [Molekulyarnyye mekhanizmy bakterionositel'stva (kharakteristika i podrobnyy analiz)]*. Saarbrücken: Palmarium academic publishing; 2012. 175 p. (in Russian)
- Aljadi S.H., Al-Shemmari M., Al-Ramzi J., Al-Abdullatif S., Hajayah Z., Jamal L. et al. Bacterial contamination in physical therapy departments in the State of Kuwait. *J Phys Ther Sci*. 2017; 29 (6): 1014–8.
- Grami D., Rtibi K., Selmi S., Jridi M., Sebai H., Marzouki L. et al. Aqueous extract of *Eruca Sativa* protects human spermatozoa from mitochondrial failure due to bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol*. 2018; 82: 103–10.
- Kong Q., He X., Feng Y., Miao M.S., Wang Q., Du Y.D. et al. Pollutant removal and microorganism evolution of activated sludge under ofloxacin selection pressure. *Bioresour Technol*. 2017; 241: 849–56.
- Boiko O.V., Ahmineeva A.Kh., Gudinskaya N.I., Boyko V.I., Kozak D.M. Age-related changes in immunological, morphological and biochemical indices of male reproductive system. *Uspekhi gerontologii*. 2014; 27 (1): 50–3. (in Russian)
- Buharin O.V., Usvyatsov B.Ya. *Bacteria carrying (medical and ecological aspect) [Bakterionositel'stvo (mediko-ekologicheskii aspekt)]*. Yekaterinburg; 1996. 206 p. (in Russian)
- Bukharin O.V., Sozykin V.L. *Innate immunity factors [Faktory yestestvennogo immuniteta]*. Orenburg; 1979. 73 p. (in Russian)
- Birger M.O. *Handbook of microbiological and virological research methods [Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniya]*. Moscow: Meditsina; 1982. 462 p. (in Russian)
- Boiko O.V., Nikolaev A.A., Ploskonos M.V. Identification of resident bacilli in urology. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2004; 9: 32–3. (in Russian)
- Kasyrov L.B. *Experimental microbiology [Eksperimental'naya mikrobiologiya]*. Sofia: Meditsina i fizkul'tura; 1965. 486 p. (in Russian)
- Galiulin R.V., Galilina R.A., Bashkin V.N. Geoecology of methanol used in the gas industry. *Delovoy zhurnal Neftegaz.RU*. 2017; 2: 84–9. (in Russian)

28. Соседова Л.М. Методические подходы к экспериментальному изучению влияния загрязнения объектов окружающей среды на организм человека. *Гигиена и санитария*. 2014; 6: 94–9.
29. Masterson E.A., Themann C.L., Luckhaupt S.E., Li J., Calvert G.M. Hearing difficulty and tinnitus among U.S. workers and non-workers in 2007. *Am J Ind Med*. 2016; 59 (4): 290–300.
30. Андриякова Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Эволюция понятия сапронозы и трансформация экологической концепции паразитизма в инфектологии. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 5: 119–26.
28. Sosedova L.M. Methodical approaches to the experimental study of the effects of environmental pollution on the human body. *Gigiena i sanitariya [Hygiene and Sanitation, Russian journal]*. 2014; 6: 94–9. (in Russian)
29. Masterson E.A., Themann C.L., Luckhaupt S.E., Li J., Calvert G.M. Hearing difficulty and tinnitus among U.S. workers and non-workers in 2007. *Am J Ind Med*. 2016; 59 (4): 290–300.
30. Andryukova B.G., Somova L.M., Timchenko N.F. Evolution of the concept of sapronosis and transformation of the ecological concept of parasitism in infectiology. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; 5: 119–26. (in Russian)