

Анализ микробиологического разнообразия криосферы на примере мерзлых грунтов Мамонтовой горы

Г.М.Единин¹, А.В.Брушков¹, Е.А.Денисенко², В.В.Веревкин², С.Н.Вирысов², С.Г.Игнатов²

¹ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», Москва, Российская Федерация;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Московская область, Российская Федерация

В статье описаны микробиологические подходы при анализе мерзлых грунтов района Мамонтовой горы в республике Саха, Якутия. Подробно описано выделение бактерий и бактериофагов из проб вечномерзлых грунтов. Представлены результаты выделения микроорганизмов из исследуемых пород.

Ключевые слова: мерзлые грунты, Мамонтова гора, бактерии, бактериофаги

Для цитирования: Единин Г.М., Брушков А.В., Денисенко Е.А., Веревкин В.В., Вирысов С.Н., Игнатов С.Г. Анализ микробиологического разнообразия криосферы на примере мерзлых грунтов Мамонтовой горы. Бактериология. 2017; 2(4): 55–59. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-55-59

Analysis of microbial diversity in the cryosphere with permafrost samples from Mount Mammoth area as an example

G.M.Edinin¹, A.V.Brushkov¹, E.A.Denisenko², V.V.Verevkin², S.N.Viryasov², S.G.Ignatov²

¹Moscow State University, Moscow, Russian Federation;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The paper deals with microbiological approaches applied in analyzing permafrost samples from the Mount Mammoth area in the Republic of Sakha, Yakutia. The process of isolation of bacteria and bacteriophages from the samples is described in detail. There is data on isolating microorganisms from analyzable geological formations.

Keywords: permafrost, Mount Mammoth, bacteria, bacteriophages

For citation: Edinin G.M., Brushkov A.V., Denisenko E.A., Verevkin V.V., Viryasov S.N., Ignatov S.G. Analysis of microbial diversity in the cryosphere with permafrost samples from Mount Mammoth area as an example. Bacteriology. 2017; 2(4): 55–59. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2017-4-55-59

В последнее время, наряду с понятиями литосферы, гидросферы и атмосферы, вводится понятие криосферы – как сфера с низкими температурами, где вода находится в основном в виде льда [1]. В настоящее время криосфера представляет собой 1/5 поверхности планеты Земля, учитывая сезонные вариации и довольно длительный тренд уменьшения своей поверхности [2]. Парадигма криосферы от «безжизненных континентов» [3] сдвигается в сторону специфических экосистем [4] и идеального места для возникновения жизни [1]. Считается, что лед как особая форма воды присутствовал во Вселенной гораздо раньше воды и останется в ней

навсегда. Благодаря своим физико-химическим свойствам лед является хорошей защитой биологического объекта от физических облучений, химических контаминаций и биологических инвазий. Поэтому криосфера Земли считается основным хранилищем биологического разнообразия [5].

Район Мамонтовой горы является уникальным участком выхода вечной мерзлоты на поверхность Земли с летними температурами до + 16°C.

Целью работы являлись выделение микроорганизмов и бактериофагов из мерзлых толщ Мамонтовой горы (Якутия) и их характеристика.

Для корреспонденции:

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией нанобиотехнологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н,

п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ

Телефон: (4967) 36-07-73

E-mail: ignatov@obolensk.org

Статья поступила 23.11.2017 г., принята к печати 22.12.2017 г.

For correspondence:

Sergey G. Ignatov, DSc in Biology, head of the bionanotechnology laboratory, department of immunobiochemistry of pathogenic microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district,

Moscow region, Russian Federation

Phone: (4967) 360773

E-mail: ignatov@obolensk.org

The article was received 23.11.2017, accepted for publication 22.12.2017

Краткое описание объекта исследований

Объект изучения – образцы мерзлых грунтов, полученные из Мамонтовой горы. Мамонтова гора (Республика Саха, Якутия) приурочена к левому берегу реки Алдан, в его нижнем течении, и представляет собой один из наиболее интересных и полных разрезов неоген-плейстоценового времени осадконакопления Восточной Сибири.

Климат района резко континентальный и суровый, с холодной зимой, теплым летом, очень малым количеством осадков и высокой годовой амплитудой температур.

Геологические характеристики Мамонтовой горы

Район Мамонтовой горы представляет собой левобережный участок долины р. Алдана, примыкающий непосредственно к руслу реки. Рельеф верхнего уровня Мамонтовой горы – самый древний в данном районе. Однако значительные изменения его происходили и происходят в настоящее время за счет деятельности современных тектонических, эрозионных и в особенности мерзлотных процессов.

Оттаивание вечномерзлых грунтов в обрыве террасы создает чрезвычайно благоприятные условия для массового сползания и оплывания рыхлого материала и быстрого (1–1,5 м в год) отступления склона. Местами можно наблюдать целые гребни (серии блоков пород) длиной 50–70 м, переместившиеся вниз по склону на 5–6 м. Верхняя часть склона, сложенная лессовидными суглинками, образует почти отвесные обрывы (склон отседания). Ниже тянутся оползневые склоны. Таким образом, склоны этой террасы в целом очень подвижны. Перемещение по ним больших масс рыхлого материала создает большие трудности для вскрытия ненарушенных слоев и отбора в них образцов.

Среднегодовые температуры на поверхности пород в пределах описываемой территории изменяются от –4 до –6°C.

Методика отбора образцов, исследования их свойств и выделения микроорганизмов

Для исследования были отобраны образцы песка в районе отложения Мамонтовой горы.

В полевых условиях из многолетнемерзлых толщ с помощью стерилизованных спиртом и обожженных в пламени инструментов отбирались образцы мерзлых пород ненарушенной структуры весом 4–6 кг, преимущественно песчаного состава с редкими прослоями мелкодисперсных грунтов и включениями органических остатков. Пробы мерзлых пород на микробиологические исследования отбирались в зонах максимальной интенсивности речной эрозии из свежесброшенных вертикальных стенок обнажения в средней и нижней его части в интервалах 5–10 м выше уреза реки и 20–30 м ниже уровня земной поверхности. Скорость термоэрозионного разрушения обнажения в местах отбора, по данным выполняемых режимных наблюдений, превышает 4–5 м в год в верхней части и достигает 1–1,5 м в средней. Отбор производился с глубин, превышающих мощность сезонноталого слоя на 1–1,5 м, что исключало попадание в зону отбора ранее оттаивавших пород. Отобранные монолиты хранились в мерзлом состоянии при температуре, близкой к естественной (–5°C). Транспортировка проб в лабораторию также осуществлялась без их оттаивания в термомониторингах с хладагентами.

Визуальное обследование отобранных образцов показало, что они представлены слоистыми тонкодисперсными отложениями с чередованием более светлых слоев алевролита толщиной от 0,5–1 мм с более темными и мощными (3–5 мм) слоями близкого гранулометрического состава.

В специально оборудованной лаборатории были определены физические свойства песка и проведено выделение микроорганизмов. Полученные образцы изучались с помощью оптического микроскопа.

В лабораторных стерильных условиях из центра образца извлекали пробу размером приблизительно 3 × 4 см, помещали в спирт на 2–3 с, после чего обжигали в пламени спиртовки. Обработанный таким образом материал переносили в пустую колбу со стерильной питательной средой и культивировали при 37°C в течение суток. Далее образцы высевали на твердую питательную среду для выделения бактерий или проводили специальные микробиологические исследования для выделения фагов.

Анализ микроорганизмов из мерзлых грунтов

В образцах древних отложений Мамонтовой горы обнаружена культивируемая бактерия, способная к аэробному и анаэробному росту. Микроорганизм является психротолерантным, т.к. способен к метаболической активности при –5°C. Бактерии представляли собой сравнительно большие (1–1,5 × 3–6 микрон) палочки, которые образовывали цепи при культивировании и были способны образовывать споры круглой формы. Данные грамположительные бактерии были неподвижны и обладали гемолитической активностью. Полученные микроорганизмы принадлежат роду *Bacillus*. Наибольшее видовое подобие выделенной бациллы отмечено с *Bacillus cereus* и *B. pumilus*.

Известно, что основной мишенью воздействия низких температур является цитоплазматическая мембрана. Данные нарушения репарируются и приводят к выживанию бактерий при длительном культивировании [1].

Можно предположить, что бактерии, сохранившие жизнеспособность в многолетнемерзлых породах, находятся там в покоящихся формах, а для перехода в вегетативное состояние им требуется около 3 сут пребывания при положительных температурах.

Поиск бактериофагов, обладающих литической активностью в отношении культуры микроорганизмов, выделенных из образца мерзлотного грунта

Бактериофаги (фаги) являются вирусными паразитами фагов. Это самые мелкие формы жизни, которые находятся в активном состоянии только внутри бактериальных клеток. В последнее время фаги привлекают внимание как инструменты борьбы с патогенными микроорганизмами, организованными в устойчивые к лекарственным препаратам биопленки [6].

Для выделения бактериофагов использовали четыре подхода.

1. Ночную культуру, выращенную на чашке со средой NA (Nutrientagar производства HiMedia Laboratories) петлей внесли в качалочную колбу с 200 мл бульонной среды LB (Luria Bertani Broth, Miller производства HiMedia Laboratories).

Колбу помещали на качалку на 1 ч при температуре 37°C. К подращенной культуре добавляли небольшое количество грунта, 100 мкл образца канализационных стоков, а также петлей внесли культуры *Bacillus subtilis* 168, *B. thuringiensis* 1373, *B. cereus* 504, *B. megaterium* 1435. Далее колбу снова помещали на качалку на 4 часа при температуре 37°C, а затем в термостат при температуре 37°C на сутки. На следующий день в колбу добавляли 20 мл хлороформа, помещали на качалку при комнатной температуре на 30 мин. После этого содержимое колбы центрифугировали в режиме 10 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Аккуратно отбирали надосадочную жидкость и перенесли в стерильную колбу.

2. Ночную культуру, выращенную на чашке со средой NA (Nutrientagar производства HiMedia Laboratories) петлей внесли в качалочную колбу с 300 мл бульонной среды LB (Luria Bertani Broth, Miller производства HiMedia Laboratories). Колбу помещали на качалку на 2 ч при температуре 37°C. Далее подращенную культуру разливали в неглубокие стерильные емкости и подвергали воздействию ультрафиолетового облучения от лампы в ламинарном шкафу в течение 1 мин. Затем культуру переносили в качалочную колбу и поместили на качалку на 4 ч при температуре 37°C, а затем в термостат при температуре 37°C на сутки. На следующий день в колбу добавляли 30 мл хлороформа и помещали на качалку при комнатной температуре на 30 мин. После этого содержимое колбы центрифугировали в режиме 10 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Аккуратно отбирали надосадочную жидкость и переносили в стерильную колбу.

Далее обе пробы центрифугировали на ультрацентрифуге «OPTIMA L-100XP» в режиме 26 000 об/мин в течение 2 ч при комнатной температуре. Аккуратно удалили надосадочную жидкость из центрифужных стаканов и высушили на фильтровальной бумаге. Далее к осадкам от пробы 1 добавляли по 3 мл фагового буфера SM (в шести центрифужных стаканах), а к осадкам пробы 2 – по 1 мл (в шести центрифужных стаканах). Затем стаканы хранили в холодильнике в течение суток. На следующий день осадки в стаканах аккуратно ресуспендировали и перенесли в две стерильные полипропиленовые пробирки, получив таким образом концентрированные препараты, обозначенные «препарат 1» и «препарат 2» соответственно.

Препарат 1 для дополнительной очистки центрифугировали в режиме 10 000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Аккуратно отобрали надосадочную жидкость и перенесли в стерильную полипропиленовую пробирку, обозначив ее как «препарат 1».

Проверили наличие литической активности в препаратах методом спот-тест

На чашку со средой наслоили 4,5 мл полужидкого агара на основе бульона LB (0,6 г агарозы на 100 мл бульона), смешанного с 0,5 мл суспензии исследуемой культуры. После того, как верхний агар застыл, на него наносили каплей по 10 мкл препарат 1 и препарат 2, дождались полного впитывания препаратов в верхний слой агара и поместили чашку в термостат на 24 ч при температуре 37°C. На следующий день проанализировали результат теста: газон культуры на чашке получился сплошной ровный, в местах нанесения капель препарата 1 и препарата 2 не наблюдалось разрыва культурального газо-

на, что свидетельствует об отсутствии литической активности этих препаратов по отношению к культуре.

3. Индукция бактериофага с помощью различных доз ультрафиолета.

В ночь до начала эксперимента культуру, выделенную из мерзлотной породы, с чашечной среды ГРМ посеяли петлей в пробирку с 5 мл бульонной среды LB, оставили на ночь в термостате при 37°C.

На следующий день приготовили чашки с двуслойным агаром и газоном суточной культуры. Для этого в стерильную пробирку внесли 0,5 мл суточной культуры, добавили 4,5 мл полужидкого агара на основе бульонной среды LB (0,6 г агарозы на 100 мл LB), хорошо перемешали и наслоили на поверхность чашечной среды ГРМ. Таким образом приготовили 5 чашек. Далее чашки инкубировали в термостате при 37°C в течение 2 ч. Чашки подвергли облучению с помощью ультрафиолетового облучателя с мощностью – 4кВт по следующей схеме.

- 1) Опыт 1 – 5 мин.
- 2) Опыт 2 – 10 мин.
- 3) Опыт 3 – 15 мин.
- 4) Опыт 4 – 20 мин.
- 5) Контроль – 30 мин при комнатной температуре без облучения.

Чашки инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч. Для обнаружения литической активности осуществляли поиск характерных бляшек на газоне исследуемой культуры.

4. Культивирование при пониженной температуре.

В ночь до начала эксперимента культуру, выделенную из мерзлотной породы, с чашечной среды ГРМ посеяли петлей в пробирку с 5 мл бульонной среды LB, оставили на ночь в термостате при 37°C. На следующий день полученную суточную бульонную культуру перенесли в колбу со свежеприготовленной бульонной средой LB в объеме 250 мл. Колбу поместили в термостат при температуре 20°C.

Продолжительность инкубации – 2 нед. Каждый день производили визуальный контроль мутности и размешивание культуральной взвеси вручную.

В конце каждой недели осуществляли отбор образца культуральной взвеси объемом 0,5 мл. В образец добавляли 50 мкл хлороформа, выдерживали в термостате при 37°C в течение часа. Далее образец центрифугировали в режиме 10 000 об/мин при комнатной температуре в течение 10 мин. Отбирали надосадочную жидкость и проверяли наличие литической активности с помощью спот-теста на газоне культуры, выделенной из мерзлотной породы.

К сожалению, в ходе этих разнообразных и длительных экспериментов нам не удалось выделить бактериофаг, лизирующий культуру, выделенную из мерзлотных пород.

Поиск бактериофагов, обладающих литической активностью в отношении других микроорганизмов

На примере клеток *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. choleraesuis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* была предпринята попытка выделения бактериофагов, обладающих литической активностью в отношении других микроорганизмов.

Наличие бактериофагов в препаратах определяли методом спот-теста (нанесение капли препарата на газон бакте-

риальной культуры). При наличии стерильного пятна лизиса на газоне бактериальной культуры его собирали в 1 мл SM буфера, добавляли 20 мкл хлороформа и использовали для дальнейшего анализа методом двухслойного агара. Наличие бляшек (негативных колоний) в верхнем слое агара указывало на фаговую природу лизиса.

Если таким способом обнаружить фаг не удавалось, использовали метод обогащения. Для этого смесь равных объемов стерильного супернатанта и 2-кратного LB бульона инфицировали суспензией бактерий одного вида и инкубировали в течение ночи при 37°C при 100 об/мин. Наличие бактериофагов в препарате искали по схеме, описанной выше.

Обсуждение и выводы

При анализе мерзлотных грунтов района Мамонтовой горы в республике Саха, Якутия, были выделены микроорганизмы, принадлежащие роду *Bacillus*. Выявленные биологические свойства бактерий, наряду с самим фактом сохранения ими жизнеспособности на протяжении значительного промежутка времени, позволяют говорить о необходимости более детального их изучения и перспективности использования выделенных штаммов в биотехнологиях. Полученные недавно результаты показывают, что микроорганизмы, выделенные из вечномерзлых грунтов, обладают протективным действием для мышей, предохраняя их от патогенных бактерий [7]. Вопрос выделения и идентификации микроорганизмов из различных сред обитания актуален не только с точки зрения физиолого-биохимических свойств древних бактерий, но и возможности обнаружения патогенов. В настоящее время существуют разнообразные подходы к выделению и идентификации микроорганизмов [8–11]. Наряду с известными иммунологическими подходами [12], разрабатываются бесконтактные методы на основе анализа газовой компоненты продуктов жизнедеятельности микроорганизмов [13]. Современные достижения в области физики и химии успешно применяются для идентификации микроорганизмов [14–18]. Понимание тонких механизмов взаимодействия древних бактерий и их фрагментов и иммунной системы позволит разработать новую стратегию эффективной терапии хронических инфекций. Предварительные результаты показали возможность такой терапии [7].

Известно, что недавно были выделены вирусы из мерзлотных пород [19]. Попытки выделения бактериофага, специфического к микроорганизму *Bacillus F*, не увенчались успехом. Более того, не удалось обнаружить других бактериофагов, обладающих литической активностью. По-видимому, это связано с тем, что микроорганизмы с интеркалированным геномом бактериофагов элиминировались в ходе длительного хранения (около 100 млн лет) в криосфере в результате спорадического аутолизиса бактерий.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Литература

1. Мельников ВП, Рогов ВВ, Курчатова АН, Брушков АВ, Грива ГИ. Распределение микроорганизмов в мерзлых грунтах. Криосфера Земли. 2011;XV(4):86-90.

2. Boetius A, Anesio AM, Deming JW, Mikucki JA, Rapp JZ. Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. Nat Rev Microbiol. 2015 Nov;13(11):677-90. DOI: 10.1038/nrmicro3522.
3. Byrd RE. Alone: the classic polar adventure. Washington, DC: Island Press/Shearwater Books, 2003, 314 p.
4. Hodson A, et al. Glacial ecosystems. Ecological Monographs. 2008;78(1):41-67.
5. Мельников ВП, Геннадик ВБ, Брушков АВ. Аспекты криософии: криоразнообразия в природе. Криосфера Земли. 2013;XVII(2):3-11.
6. Игнатов СГ, Волошин АГ, Федюкина ГН, Ганина ЕА, Мочалов ВВ, Денисенко ЕА, Перовская ОН. Бактериальные биопленки и фаги. Инфекция и иммунитет. Спец. выпуск. 2014, с. 82-3.
7. Fursova O, Potapov V, Brouchkov A, Pogorelko G, Griva G, Fursova N, Ignatov S. Probiotic activity of a bacterial strain isolated from ancient permafrost against salmonella infection in mice. Probiotics Antimicrob Proteins. 2012 Sep;4(3):145-53. DOI: 10.1007/s12602-012-9105-z.
8. Волошин АГ, Бунин ВД, Акимова ЛА, Игнатов СГ. Патент РФ №2431834 (2011) Способ выделения и идентификации бактерий.
9. Игнатов СГ, Волошин АГ, Бунин ВД, Дятлов ИА. Электрооптический анализ в микробиологии. Монография. Оболенск: ГУП МО «Серпуховская типография», 2007.
10. Лапыш МЕ, Светогоров ДЕ, Игнатов СГ. Определение анизотропии поляризуемости бактериальных клеток при средней степени ориентации. Коллоидный журнал. 1991;53(2):365-7.
11. Тюрин ЕА, Дятлов ИА, Игнатов СГ. Современные методы определения патогенных микроорганизмов. Нанотехнологии и охрана здоровья. 2012;4(10):34-41.
12. Иващенко ТА, Белова ЕВ, Дентовская СВ, Белькова СА, Балахонов СВ, Игнатов СГ, Шемякин ИГ. Разработка и испытание иммуноферментной моноклональной тест-системы для выявления в антигена *Yersinia pestis*. Прикладная биохимия и микробиология. 2014;50(2):211-8. DOI: 10.7868/S055510991402010X
13. Волошин АГ, Филиппович СЮ, Бачурина ГП, Бесаева СГ, Игнатов СГ. Спектрометрический анализ летучих компонентов микроорганизмов. Прикладная биохимия и микробиология. 2010;46(3):331-5.
14. Дубровин ЕВ, Краевский СВ, Игнатьев ТЕ, Федюкина ГН, Игнатов СГ. Патент РФ №2437937 (2011) Способ определения наличия бактерий *Escherichia coli detection* по детектированию их фрагментов с помощью атомно-силовой микроскопии.
15. Игнатов СГ, Виравсов СН, Федюкина ГН. Применение АСМ для специфической визуализации микроорганизмов. В кн.: Молекулярная диагностика – 2007. Под редакцией В.И.Покровского. М., 2007, с. 81-82.
16. Уткин ДВ, Германчук ВГ, Спицын АН, Ерохин ПС, Кузнецов ОС, Куклев ВЕ, и др. Биосенсорные технологии в диагностике инфекционных болезней. Монография. Под ред. Кутырева ВВ. Тверь: Триада, 2014, 111 с.
17. Dubrovina EV, Yaminsky IV, Fedyukina GN, Ignatov SG, Kraevsky SV, Ignatyuk TE. AFM specific identification of bacterial cell fragments on biofunctional surfaces. Open Microbiol J. 2012;6:22-8. DOI: 10.2174/1874285801206010022.
18. Ignatyuk TE, Ivanova OE, Ereemeeva TP, Fedjukina GN, Voloshin AG, Akimova LA, et al. Immobilization of viruses using langmuir antibody films based on amphiphilic polyelectrolytes for atomic force microscopy. In: Advances in single molecule research for biology and nanoscience. Proceedings of the IX. Linz Winter Workshop 2007. Linz: Trauner, 2008, p. 86-90.
19. Legendre M, Bartoli J, Shmakova L, Jeudy S, Labadie K, Adrait A, et al. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Mar 18;111(11):4274-9. DOI: 10.1073/pnas.1320670111

References

1. Mel'nikov VP, Rogov VV, Kurchatova AN, Brushkov AV, Griva GI. Raspredelenie mikroorganizmov v merzlykh gruntakh. Kriosfera Zemli. 2011;XV(4):86-90. (In Russian).

2. Boetius A, Anesio AM, Deming JW, Mikucki JA, Rapp JZ. Microbial ecology of the cryosphere: sea ice and glacial habitats. *Nat Rev Microbiol.* 2015 Nov;13(11): 677-90. DOI: 10.1038/nrmicro3522.
3. Byrd RE. *Alone: the classic polar adventure.* Washington, DC: Island Press/Shearwater Books, 2003, 314 p.
4. Hodson A, et al. Glacial ecosystems. *Ecological Monographs.* 2008;78(1):41-67. (In Russian).
5. Mel'nikov VP, Gennadinik VB, Brushkov AV. Aspekty kriosofii: krioraznoobrazie v prirode. *Kriosfera Zemli.* 2013;XVII(2):3-11. (In Russian).
6. Ignatov SG, Voloshin AG, Fedyukina GN, Ganina EA, Mochalov VV, Denisenko EA, Perovskaya ON. Bakterial'nye bioplenki i fagi. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2014;S:82-3. (In Russian).
7. Fursova O, Potapov V, Brouchkov A, Pogorelko G, Griva G, Fursova N, Ignatov S. Probiotic activity of a bacterial strain isolated from ancient permafrost against salmonella infection in mice. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2012 Sep;4(3): 145-53. DOI: 10.1007/s12602-012-9105-z.
8. Voloshin AG, Bunin VD, Akimova LA, Ignatov SG. Patent RUS №2431834 (2011) Method of isolation and identification of bacteria. (In Russian).
9. Ignatov SG, Voloshin AG, Bunin VD, Dyatlov IA. Elektroopticheskii analiz v mikrobiologii [Electro-optical analysis in microbiology]. *Obolensk: «Serpukhovskaya tipografiya» Publ., 2007.* (In Russian).
10. Lapysh ME, Svetogorov DE, Ignatov SG. Determination of the anisotropy of polarizable bacterial cells at the medium orientation degree. *Colloid Journal.* 1991;53(2):365-7. (In Russian).
11. Tyurin EA, Dyatlov IA, Ignatov SG. Sovremennyye metody opredeleniya patogennykh mikroorganizmov. *Nanotekhnologii i okhrana zdorov'ya.* 2012;4(10):34-41. (In Russian).
12. Ivaschenko TA, Belova EV, Dentovskaya SV, Ignatov SG, Shemyakin IG, Belkova SA, Balakhonov SV. Development and testing of an enzyme immunoassay-based monoclonal test system for the detection of the *Yersinia pestis* V antigen. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2014;50(2):187-93. DOI: 10.7868/S055510991402010X (In Russian).
13. Voloshin AG, Besaeva SG, Ignatov SG, Filippovich SY, Bachurina GP. Spectrophotometric analysis of volatile compounds in microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2010;46(3):303-6. (In Russian).
14. Dubrovin EV, Kraevskii SV, Ignatyuk TE, Fedyukina GN, Ignatov SG. Patent RUS №2437937 (2011) Method for determining the presence of *Escherichia coli* detection bacteria by detecting their fragments using atomic force microscopy. (In Russian).
15. Ignatov SG, Viryasov SN, Fedyukina GN. Primenenie ASM dlya spetsificheskoi vizualizatsii mikroorganizmov. In: *Molecular diagnosis – 2007.* Edited by V.I. Pokrovskogo. Moscow, 2007, pp. 81-82. (In Russian).
16. Utkin DV, Germanchuk VG, Spitsyn AN, Erokhin PS, Kuznetsov OS, Kuklev VE, et al. Biosensornyye tekhnologii v diagnostike infektsionnykh boleznei [Biosensor technology in diagnostics of infectious diseases]. Edited by Kutyreva VV. *Tver': "Triada" Publ., 2014, 111 p.* (In Russian).
17. Dubrovin EV, Yaminsky IV, Fedyukina GN, Ignatov SG, Kraevskiy SV, Ignatyuk TE. AFM specific identification of bacterial cell fragments on biofunctional surfaces. *Open Microbiol J.* 2012;6:22-8. DOI: 10.2174/1874285801206010022.
18. Ignatyuk TE, Ivanova OE, Ereemeeva TP, Fedjukina GN, Voloshin AG, Akimova LA, et al. Immobilization of viruses using langmuir antibody films based on amphiphilic polyelectrolytes for atomic force microscopy. In: *Advances in single molecule research for biology and nanoscience. Proceedings of the IX. Linz Winter Workshop 2007.* Linz: Trauner, 2008, p. 86-90.
19. Legendre M, Bartoli J, Shmakova L, Jeudy S, Labadie K, Adrait A, et al. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Mar 18;111(11): 4274-9. DOI: 10.1073/pnas.1320670111

Информация об авторах:

Единин Григорий Михайлович, аспирант кафедры геокриологии геологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»
 Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы
 Телефон: (495) 939-1728
 E-mail: edidin.grigory@gmail.com

Брушков Анатолий Викторович, доктор геолого-минералогических наук, профессор, заведующий кафедрой геокриологии геологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»
 Адрес: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы
 Телефон: (495) 939-1728
 E-mail: brouchkov@geol.msu.ru

Денисенко Егор Алексеевич, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
 Адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховской р-н, п. Оболенск
 Телефон: (4967) 36-0147
 E-mail: EgorD1988@gmail.com

Веревкин Владимир Васильевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск
 Телефон: (4967) 36-0147
 E-mail: lab-mdgip@mail.ru

Вирьясов Сергей Николаевич, кандидат физико-математических наук, заведующий отделом биофизики ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
 Адрес: 142279, Россия, Московская область, Серпуховской р-н, п. Оболенск
 Телефон: (4967) 36-0773
 E-mail: viryasov@obolensk.org

Information about authors:

Grigory M. Edinin, postgraduate student, of the department of geocryology, faculty of geology, Lomonosov Moscow State University
 Address: Faculty of Geology, Russia, 119991, Moscow, GSP-1, 1 Leninskiye Gory
 Phone: (495) 939-1728
 E-mail: edidin.grigory@gmail.com

Anatoliy V. Brushkov, Dr. Sci. (Geol), professor, head of the department of geocryology, faculty of geology, Lomonosov Moscow State University
 Address: Faculty of Geology, Russia, 119991, Moscow, GSP-1, 1 Leninskiye Gory
 Phone: (495) 939-1728
 E-mail: brouchkov@geol.msu.ru

Yegor A. Denisenko, researcher of the laboratory of molecular diagnostics and genetically engineered preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967)36-0147
 E-mail: EgorD1988@gmail.com

Vladimir V. Verevkin, PhD (Biol), senior researcher of the laboratory of molecular diagnostics and genetically engineered preparations, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0147
 E-mail: lab-mdgip@mail.ru

Sergey N. Viryasov, PhD (Phys.-Math.), head of the department of biophysics, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0773
 E-mail: viryasov@obolensk.org

Тезисы докладов III Национального конгресса бактериологов (дополнение). В рамках XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (ВНОЭМП)

Москва, 16–17 ноября 2017 г.

Эффективность применения молекулярно-биологических методов исследования при вспышках норовирусной инфекции в г. Ярославле

Аверкиева Т.В.¹, Кузьмина Г.В.², Саляхутдинова Н.В.²,
Барановская Т.Н.², Деменчук М.Ю.²

¹Управление Роспотребнадзора по Ярославской области,
Ярославль;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской
области», Ярославль

Проведена оценка эффективности применения методов ПЦР-диагностики в расшифровке вспышек острых кишечных инфекций, имевших место в Ярославле в 2015–2017 гг.

Материалом для исследования служили фекалии от больных и контактных в очагах острых кишечных инфекций с целью установления этиологии заболевания, выявления источника инфекции. Исследования были проведены методом ПЦР с использованием тест-системы «Ампли-Сенс-Rotavirus (группаА)/Norovirus (геногруппаII)/Astrovirus-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора). Амплификатор – «Rotor-Gene 6000».

С 2011 по 2016 гг. на базе бактериологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ярославской области» были проведено 9650 исследований на рота-, норо- и астровирусную инфекции с выделением РНК вирусов – 435 исследований, из них 341 исследование (78%) – с определением норовирусов (геногруппа II). В декабре 2016 г. наше внимание привлекла вспышка в СОШ №1. В лабораторию были доставлены фекалии от 62 человек. Ввиду недостатка диагностикумов, чтобы расшифровать вспышку биоматериал (43 образца) был направлен в референс-центр по мониторингу за ОКИ ФБУН ЦНИИ эпидемиологии (г. Москва), где в 34 образцах (81%) была выявлена РНК норовирусов I геногруппы. Проведено генотипи-

рование норовирусов. Результат типирования: NoV геногруппа I, генотип-4. Результаты субвидового типирования норовирусов позволили расценить случаи заболевания как потенциально связанные между собой. Тест-система для ПЦР, применяемая в практике, предусматривает определение норовирусов только второй геногруппы.

В марте 2017 г. в МОУ СОШ №33 произошла еще одна крупная вспышка острого гастроэнтерита. Исследован биоматериал (фекалии) от 41 человека. У 22 человек выявлена РНК *Norovirus* II геногруппы. Образцы клинического материала были направлены в референс-центр, где было подтверждено присутствие РНК *Norovirus* II геногруппы и проведено генотипирование норовирусов. Результат типирования: NoV геногруппа II, генотип-16. Эти исследования подтверждают данные международной сети надзора за норовирусами *NoroNet* о том, что в зимний сезон 2016–2017 гг. на территории Германии, Австралии, Финляндии, Нидерландов, Франции, России, Китая и Японии отмечены случаи выявления рекомбинантного генотипа норовирусов NoV GII.P16. По данным из Германии и Японии, данный генотип NoV GII.P16 к февралю 2017 г. практически вытеснил доминировавший ранее эпидемический генотип NoV GII.P17. Зарегистрированная вспышка норовирусной инфекции в МОУ СОШ №33 г. Ярославля подтверждает высокий эпидемический потенциал рекомбинантного варианта норовируса NoV GII.P16.

Выводы.

1. Метод полимеразной цепной реакции является эффективным методом диагностики острых гастроэнтеритов.

2. Основными этиологическими агентами при вспышках острого гастроэнтерита в Ярославле за анализируемый период являются норовирусы. Ведущая роль принадлежит норовирусам второй геногруппы. Внутри геногруппы II норовирусы различных генотипов могут циркулировать одновременно или вытеснять друг друга, вызывая как спорадическую, так и вспышечную заболеваемость.

3. Для обеспечения проведения эффективной этиологической диагностики диарейных заболеваний необходимо внедрение в практику новых тест-систем для выявления норовирусов первой геногруппы.

Современные аспекты организации деятельности бактериологических лабораторий Роспотребнадзора на территориальном уровне

Молдованов В.В.¹, Кобышева Е.В.¹, Подкорытов Ю.И.²

¹Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» в Юго-Восточном административном округе города Москвы;

²Управление Роспотребнадзора по железнодорожному транспорту, Москва

Результаты бактериологического лабораторного контроля являются одним из ведущих элементов в разработке программ деятельности по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения и санитарно-эпидемиологического надзора. При составлении планов лабораторных исследований необходимо осуществлять углубленный анализ санитарно-эпидемиологического состояния объектов с учетом специфики функционирования учреждений, подлежащих обследованию. Объемы и частота лабораторных анализов должны обеспечивать получение статистически достоверных данных о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия объектов надзора. При организации бактериологических исследований важным моментом является организация обеспечения качества проб, доставляемых в лабораторию. Методы и время отбора проб для исследования зачастую остаются вне контроля лаборатории, однако быстрое начало исследования образца в лаборатории даст возможность достижения наиболее достоверного результата. По имеющимся данным (Шепелин А.П., Домотенко Л.В., 2015), использование специальных транспортных сред позволяет обеспечить сохранение жизнеспособности микроорганизмов в течение 48–72 ч, без резкого изменения концентрации микроорганизмов в пробах, что крайне важно при исследовании материала из объектов окружающей среды на отдаленных территориях обслуживания. При организации лабораторных исследований важным моментом является также определение чувствительности бактериальных культур к антибиотикам и другим антимикробным средствам, особенно обнаруженных в пробах атмосферного воздуха из детских дошкольных учреждений.

В микробиологической лаборатории филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» в ЮАО г. Москвы работа ежегодно проводится в соответствии с годовыми, полугодовыми, квартальными планами. В лаборатории ежегодно проводится около 80 тысяч бактериологических исследований. Уделяется серьезное внимание вопросам повышения готовности лаборатории и специалистов к выполнению качественных исследований, в соответствии с действующими нормативными документами. С целью проведения внутреннего контроля качества работ ежегодно проводятся исследования зашифрованных образцов (по санитарной бактериологии, паразитологии и другим видам воз-

будителей, в том числе и по холере), подготовленных в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве». Все зашифрованные задачи были решены правильно. Поддержание готовности лаборатории и специалистов к качественному выполнению анализов остается актуальной задачей.

Проблемы диагностики особо опасных инфекций в муниципальных бактериологических лабораториях

Подкорытов Ю.И.

Управление Роспотребнадзора по железнодорожному транспорту, Москва

Заболеваемость особо опасными инфекциями среди населения Российской Федерации находится чаще на спорадическом уровне. Однако как с позиций санитарной охраны территории, так и профилактики заболеваний вопросы лабораторной диагностики особо опасных инфекций на территориальном уровне остаются актуальными. Известно, что в отдельных регионах Российской Федерации неоднократно наблюдался завоз больных холерой различными видами транспорта. В связи с этим от готовности территориальных бактериологических лабораторий к проведению первичной лабораторной диагностики холеры (как материала от больных, так и из объектов окружающей среды) во многом зависит своевременность начала проведения противоэпидемических мероприятий по предупреждению распространения холеры. Качество проведения исследований на холеру во многом определяется пригодностью питательных сред, которые должны быть под контролем лабораторий особо опасных инфекций, а также укомплектованностью лабораторий диагностическими холерными сыворотками (О1-, Инаба-, Огава- и О139-). При этом, следует учитывать, что в пробах из водных источников нередко выявляются холерные вибрионы серологических вариантов, отличных от О1-группы, Окончательный анализ исследований на холеру и идентификация выделенных культур должны осуществляться в специализированных лабораториях противочумных учреждений, курирующих конкретные регионы.

От готовности территориальных бактериологических лабораторий к принятию мер по организации диагностики других особо опасных инфекций также зависит своевременность осуществления лабораторного анализа, локализации и ликвидации очагов заболевания. В связи с этим, в лабораториях желательно иметь адреса и телефоны референс-центров по диагностике особо опасных инфекций.

В территориальных бактериологических лабораториях в некоторых случаях приходится проводить серологические исследования на особо опасные инфекции. Характерен случай заражения 42-летнего охотника туляремией на Дальнем Востоке, когда соболь укусил охотника за палец. После появления симптомов туляремии при лабораторном исследовании сыворотки крови у него были выявлены антитела к туляремийному микробу в титре 1:640.

Таким образом, вопросы готовности территориальных бактериологических лабораторий по диагностике некоторых особо опасных инфекций остаются актуальной задачей.