

Экспериментальное изучение факторов антимикробной активности минеральной воды «Усть-Качкинская»

Ю. Н. Маслов¹, И. П. Корюкина¹, В. В. Сидоров²

¹ Центральная научно-исследовательская лаборатория Пермской государственной медицинской академии,

² ЗАО «Курорт «Усть-Качка», г. Пермь

Одним из проявлений неослабевающего интереса к бальнеологии можно считать расширение «смежных» исследований (морфологических, физиологических, иммунологических, микробиологических и т. д.), изучающих механизмы влияния бальнеологических факторов. Микробиологические исследования, чаще всего, оценивают результаты воздействия на нормофлору организма человека. Это, действительно, весьма важный путь реализации эффектов бальнеотерапии, так как совокупность микробных биоценозов человеческого организма считают своеобразным метаболическим органом, выполняющим достаточно сложные и разнообразные функции. Не менее важно влияние бальнеологических факторов на уровень колонизации организма человека условно-патогенными микроорганизмами. К сожалению, оценка конечных результатов воздействия бальнеолечения зачастую не сопровождается попытками разобраться в механизмах их влияния. Этот недостаток можно отнести и к микробиологическим исследованиям в этой области. Обычно все антимикробные эффекты объясняются присутствием «биологически активных компонентов» в минеральной воде или лечебной грязи и дальше этого понятия объяснения не идут. Все чаще антимикробную активность минеральных вод (далее — МВ) связывают с присутствием в них собственной микрофлоры [4, 9, 10]. Органические компоненты МВ, образующиеся в результате жизнедеятельности аутохтонной бактериальной (реже — грибовой) флоры, способны существенно влиять на бальнеологические свойства МВ [3, 7, 8].

Сведения о видовой принадлежности аутохтонной микрофлоры немногочисленны [1, 8, 9]. Чаще описывают неферментирующие грамотрицательные бактерии семейства *Pseudomonadaceae* либо подсемейства *Achromobacter*, реже упоминаются углеводородокисляющие, сульфатредуцирующие, аммонифицирующие, тионовокислые бактерии,

железобактерии, бактерии-нитрификаторы, а также различные грибковые культуры, адаптировавшиеся к существованию в МВ [4, 5].

Способность микроорганизмов, обитающих в МВ, оказывать влияние на организм человека связана, прежде всего, с адьювантной активностью фрагментов клеточной стенки, высвобождающихся при разрушении бактерий. Эти компоненты способны оказывать стимулирующее действие на различные звенья гуморального и клеточного иммунитета, а также активировать факторы неспецифической резистентности.

Аутохтонная флора способна оказать влияние и на микробиоценозы организма человека. «Прижизненное» влияние может реализовываться через продукты метаболизма (кислоты, пигменты, бактериоцины и т. д.), «посмертное» — за счет структурных компонентов клетки (элементов бактериальной стенки и органоидов), высвобождающихся при разрушении. В основе антимикробных эффектов МВ лежит влияние комплекса факторов, где ведущую роль играют биологические компоненты микробного происхождения, а также другие органические составляющие. Неорганические компоненты МВ являются второй составляющей антимикробной активности: они создают необходимый фон, способствующий проявлению антибактериальных факторов [2, 9].

Таким образом, изучение антимикробных свойств МВ, основанное на выявлении аутохтонной микрофлоры и исследовании ее свойств, а также на оценке биологической активности химических компонентов, представляются новым подходом, позволяющим глубже оценить механизмы лечебно-профилактического воздействия бальнеологических факторов на организм человека.

На курорте «Усть-Качка» с 2000 года функционирует источник питьевой МВ, получившей название «Усть-Качкинская». По составу данная МВ относится к сульфатно-хлоридным кальциево-натриевым водам Ергенинского типа (ГОСТ 13273–88, группа XVIII). Общая

минерализация составляет 8,2–8,6 г/дм³; в состав воды входят такие микрокомпоненты лечебного действия, как бром, йод, бор и кремний. Антимикробные свойства МВ «Усть-Качкинская» описаны нами ранее [6].

Цель исследования — выявить природу антимикробной активности МВ «Усть-Качкинская».

В задачи работы входили:

- выявление аутохтонной микрофлоры МВ «Усть-Качкинская» и изучение ее антагонистической активности;

- оценка взаимодействия аутохтонной флоры и химических компонентов МВ «Усть-Качкинская» при угнетающем влиянии на микробные культуры;

- изучение влияния химических макро- и микрокомпонентов МВ «Усть-Качкинская» на темпы репродукции микробных культур.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали нативную МВ «Усть-Качкинская» и два искусственных раствора, приготовленных на основе дистиллированной воды. Первый из них (раствор №1) воспроизводил состав МВ «Усть-Качкинская» по макроэлементам (натрию, кальцию, хлориду, сульфату и бикарбонату), а второй (раствор №2) содержал, помимо вышеуказанных компонентов, микроэлементы данной МВ (Br^- , J^- , Mn^{2+} , Cu^{2+} , H_3BO_3) в аналогичных концентрациях. В качестве контроля применяли 0,85%-ный раствор хлористого натрия, который сопоставим с МВ «Усть-Качкинская» по показателям осмотического давления и pH.

Для выделения культур аутохтонной флоры из МВ «Усть-Качкинская» использовали мембранные фильтры, идентификацию проводили с использованием биохимических наборов «Нефермтест» («Lachema») и компьютерного комплекса *Multiscan RS (Labsystem)*.

При изучении антагонистической активности микробной культуры использовали метод поперечных штрихов, а при исследовании антимикробной активности фильтратов культур применяли методику, идентичную определению фагочувствительности бактерий. В качестве тест-культур применяли грамположительные (*S. aureus*) и грамотрицательные (*E. coli*) бактерии, а также дрожжеподобные грибки (*C. albicans*). Всего использовано 30 культур, среди которых были музейные штаммы (*S. aureus* 209P, *S. aureus* ATCC 351, *E. coli* K-12,) и клинические изоляты. Эксперименты проводили на стандартных средах (питательный агар и бульон) производства Пермского НПО «Биомед».

В третьей серии экспериментов для выявления в химическом составе МВ «Усть-Кач-

кинская» компонентов, придающих ей антимикробную активность, использовали методику, описанную нами ранее [6]. Взвеси суточных микробных культур делили на 4 части, которые вносили в пробирки с нативной МВ, контрольным 0,85% раствором NaCl или растворами №№ 1 и 2. После контакта микроорганизмы рассеивали на чашки с питательным агаром в количестве не более 10–12 КОЕ на чашку и инкубировали при 37° С. В качестве интегрального показателя влияния растворов на микробные культуры использовали диаметр выросших колоний. Оценку проводили при помощи микроскопа МБС-10 с окуляр-микрометром.

Биометрический анализ полученных результатов проведен с использованием парных коэффициентов Стьюдента и Уилкоксона. При проверке статистических гипотез критический уровень значимости принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При изучении микробиологических показателей качества данной МВ нами было обнаружено постоянное присутствие в ней неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОВ). Концентрация этих микроорганизмов составляла от 3 до 10 КОЕ/л. Культура обладала типичной для НГОВ морфологией (неподвижные тонкие палочки), биохимическими свойствами (наличие оксидазной и протеолитической активности) и способностью образовывать желто-оранжевый пигмент. По результатам исследования биохимических свойств культура отнесена к виду *Flavobacterium odoratum*.

Выделенная культура флавобактерий не проявляла способности колонизировать организм человека, поскольку при повторных микробиологических обследованиях пациентов после бальнеотерапии с использованием МВ «Усть-Качкинская» (более 100 человек) она ни разу не была обнаружена. В то же время одним из результатов такого лечения явились изменения в микробных сообществах организма человека.

Для оценки возможной связи антимикробных свойств МВ «Усть-Качкинская» с влиянием содержащейся в ней микрофлоры было предпринято, прежде всего, изучение антагонистических свойств выделенной культуры флавобактерий.

Выяснилось, что эта культура обладает способностью угнетать рост всех использованных нами микробных культур. В табл. 1 представлены средние показатели 10 проведенных экспериментов. Активность метаболитов флавобактерий была наиболее выраженной против грамотрицательных бактерий.

Для выяснения связи антимикробной активности МВ «Усть-Качкинская» с химическим

составом воды в следующей серии экспериментов культивирование *Fl. odoratum* проводили непосредственно в данной МВ. Контролем служила культура *Fl. odoratum*, выращенная в синтетическом аналоге МВ «Усть-Качкинская» — растворе №1, воспроизводящем ее химический состав по макрокомпонентам (натрию, кальцию, хлориду, сульфату и бикарбонату). Предварительное выращивание *Fl. odoratum* проводили в течение 9–10 суток, чтобы культура за это время достигла стационарной фазы развития и в среде присутствовали бы не только метаболиты, но и структурные компоненты погибших бактериальных клеток. Фильтраты 9–10-дневных культур в объеме 10 мкл наносили на поверхность чашек, засеянных бактериаль-

ными и грибковыми тест-штаммами. Результаты оценивали по диаметру зон угнетения роста.

В третьей серии экспериментов сопоставлена способность нативной МВ и ее синтетических аналогов (растворов №1 и №2) замедлять рост микробных культур по сравнению с физиологическим раствором. Результаты, представленные в табл. 2, свидетельствуют, прежде всего, о том, что МВ «Усть-Качкинская» обладает способностью замедлять темпы развития всех использованных в эксперименте микробных культур: колонии бактерий и грибов после контакта с МВ имели меньший диаметр, нежели после контакта с контрольным раствором (различия статистически значимы для всех тест-культур). Синтетический аналог

Таблица 1. Показатели антагонистической активности культуры *Flavobacterium odoratum*

Показатели антагонистической активности	Вид тест-культуры		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Средняя величина зоны угнетения роста, $M \pm m^*$, мм	$8,57 \pm 0,43$	$5,43 \pm 0,99$	$4,57 \pm 0,48$
% чувствительных культур	100	80	100

Примечание. * M — выборочное среднее; m — ошибка выборочного среднего; объем выборки $n = 10$ для каждой из тест-культур

Таблица 2. Антагонистическая активность фильтратов культуры *Flavobacterium odoratum*, $M \pm m^*$, мм

Вид среды	Вид тест-культуры		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Нативная МВ	$8,51 \pm 0,28^{**}$	$7,00 \pm 0,31^{***}$	$6,50 \pm 0,19^{****}$
Синтетическая МВ	$7,21 \pm 0,26$	$5,86 \pm 0,26$	$5,43 \pm 0,23$

Примечание. * M — выборочное среднее; m — ошибка выборочного среднего; объем выборки $n = 7$ для каждой из тест-культур;

** уровень значимости различий по критерию Стьюдента $p = 0,000$; по критерию Уилкоксона $p < 0,016$;

*** уровень значимости различий по критерию Стьюдента $p = 0,005$; по критерию Уилкоксона $p < 0,032$;

**** уровень значимости различий по критерию Стьюдента $p = 0,002$; по критерию Уилкоксона $p < 0,016$.

Таблица 3. Средний диаметр колоний микробных культур после контакта с исследуемыми растворами в течение 30 мин, $M \pm m^*$, мм

Вид раствора	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Нативная МВ	$4,55 \pm 0,03$	$1,58 \pm 0,03$	$2,66 \pm 0,04$
Физиол. раствор	$4,78 \pm 0,03$	$2,07 \pm 0,03$	$3,02 \pm 0,05$
Синтет. раствор №1	$4,70 \pm 0,02$	$2,11 \pm 0,03$	$3,00 \pm 0,04$
Синтет. раствор №2	$4,60 \pm 0,03$	$1,96 \pm 0,03$	$2,85 \pm 0,03$

Примечание. * M — выборочное среднее; m — ошибка выборочного среднего; объем выборки $n = 10$ для каждой из тест-культур;

** уровень значимости различий (нативная МВ/физ.р-р) по критерию Стьюдента $p < 0,001$; по критерию Уилкоксона $p < 0,02$;

*** уровень значимости различий (раствор №1/физ.р-р) по критерию Стьюдента ($p > 0,05$); по критерию Уилкоксона ($p > 0,05$);

**** уровень значимости различий (раствор №2/физ.р-р) по критерию Стьюдента ($p < 0,01$) и Уилкоксона ($p < 0,02$); культур *E. coli* и *C. albicans* $p = 0,002$; по критерию Уилкоксона $p < 0,016$.

МВ, содержащий только макроэлементы, (раствор №1) не обладал антимикробной активностью: средние значения диаметров колоний для всех культур были практически идентичны контрольным, а показатели значимости различий превышали критический уровень ($p = 0,05$), и подтверждали нулевую гипотезу.

Синтетический раствор №2, содержащий практически полный набор химических компонентов МВ, на наш взгляд, обладал способностью угнетать рост тест-культур, хотя статистически значимые различия с контрольными показателями удалось подтвердить только для культур кишечной палочки и дрожжеподобных грибов (табл. 3). Исходя из этого, можно сделать заключение, что антимикробная активность МВ «Усть-Качкинская» лишь частично связана с комплексом ее химических микрокомпонентов.

Безусловно, условия проведенных экспериментов отличаются от естественных. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют о том, что аутохтонная микрофлора МВ «Усть-Качкинская» обладает способностью подавлять *in vitro* рост бактерий и грибов. При этом наблюдается синергическое взаимодействие между факторами микробного происхождения и химическими микрокомпонентами МВ «Усть-Качкинская». Это, по крайней мере,

частично разъясняет природу антимикробной активности МВ «Усть-Качкинская». Необходимым представляется продолжение этих исследований, направленное на выявление возможного присутствия других представителей аутохтонной микрофлоры, а также на выяснение вклада отдельных микрокомпонентов химической природы в антимикробные свойства МВ «Усть-Качкинская». Дальнейшее изучение природы антимикробной активности минеральных вод в предлагаемом направлении позволит глубже изучить механизмы их лечебно-профилактического действия, уточнить и расширить перечень показаний к применению.

Выводы

1. Метаболиты и структурные компоненты культуры *Flavobacterium odoratum*, выделенной из МВ «Усть-Качкинская», обладают способностью угнетать рост культур грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также дрожжеподобных грибов.

2. Фильтраты культуры *Flavobacterium odoratum* и химические микрокомпоненты МВ «Усть-Качкинская» выступают как синергисты в отношении угнетаемых микробных культур.

3. Антимикробная активность МВ «Усть-Качкинская» частично связана с химическими микрокомпонентами данной воды.

Литература

1. Бадретдинова Л. М., Гильмутдинова Л. Т., Бойко Т. Ф. Микробиологическая оценка минеральных вод // Актуальные проблемы восстановительной медицины, курортологии и физиотерапии: Матер. Международного конгресса «Здравница — 2003» г. Кисловодск — М., 2003. — С. 39.
2. Гаранина О. П. Выживаемость патогенных и комменсальных микробов в минеральной воде курортов «оз. Шира» и «оз. Учум»: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Томск. — 1972. — 22 с.
3. Гаспарян А. В., Игумнов В. А. Микрофлора различных типов минеральных вод // Вопр. курортол. — 1985. — №5. — С.57–60.
4. Квасников Е. И., Ключникова Т. М. Микроорганизмы — деструкторы нефти в водных бассейнах. — Киев: Наук. Думка, 1981. — 132 с.
5. Максимович К. А., Николаенко С. И. Антимикробные свойства слабоминерализованных вод Трускавецкого и Сходниского месторождений. — М., 1984. 7 с. Деп. во ВНИИМИ МЗ СССР №8383–84.
6. Маслов Ю. Н. Антимикробные свойства питьевой минеральной воды «Усть-Качкинская» // Пермский медицинский журнал, 2003. — №3–4. — С.91–98.
7. Николаенко С. И. Микробиология питьевых минеральных вод // Вопр. курортол. — 1992. — №3. — С.71–72.
8. Феодосиади Н. И. Микрофлора, бактериостатическое и бактерицидное действие термальных вод Зауралья: Автореф. дис... канд. мед. наук. — Свердловск, 1970. — 20 с.
9. Chudoba J., Heizlar J., Dolezal M. Autochthonous microflora and its metabolism. // Water Res. — 1986. — Vol.20. №10. — P.1223 — 1227.
10. Dott W., Frank Ch., Kampfer P. et al. Microflora of sursoil and drinking waters // Zbl. Bakt. J. Abt. Orig. A. — 1986. — Bd.182, №5–6. — S. 449.