

И.Ю. Рой, Н.А. Клименко, Г.М. Здоровенко, В.В. Гончарук

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ВОДЫ, УСТОЙЧИВЫХ К СОЕДИНЕНИЯМ ХЛОРА

Институт коллоидной химии и химии воды
им. А. В. Думанского
НАН Украины, г. Киев
roy_inka@ukr.net

*Изучены морфолого-культуральные особенности трех доминирующих бактериальных культур, изолированных из питьевой водопроводной воды и проб воды, отобранной на различных этапах ее доочистки на установке водоподготовки предприятия специальных напитков. Проанализирован видовой состав выделенных бактериальных изолятов по последовательностям гена 16S рРНК. Идентифицированы следующие виды бактерий: *Bacillus nanhaiensis*, *Brevibacterium frigoritolerans* и *Lysinibacillus fusiformis*. Установлено, что наиболее резистентной к хлору оказалась *Lysinibacillus fusiformis*. Ее устойчивость к NaOCl при концентрациях 1,4; 3; 5 и 7 мг/дм³ варьирует в пределах 1 – 98% (продолжительность экспозиции – от 5 до 60 мин), в то время как остальные два изолята *Bacillus nanhaiensis* и *Brevibacterium frigoritolerans* продемонстрировали низкую выживаемость в присутствии NaOCl (0 – 16%).*

Ключевые слова: биопленка, гормезис, хлоррезистентность, *Bacillus nanhaiensis*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Lysinibacillus fusiformis*.

Введение. Доочистка водопроводной воды для нужд производства на предприятиях пищевой промышленности является распространенной практикой. Одной из главных проблем такой очистки являются микробные загрязнения, присутствующие либо в исходной воде, либо вносимые в очищаемую воду при ее обработке. При фильтровании воды сквозь слой песка и активного угля (АУ) важную роль играют бактериальные биопленки [1]. Скоординированная активность сообщества микробов делает биопленки малоуязвимыми для действия дезинфектантов [2].

© И.Ю. Рой, Н.А. Клименко, Г.М. Здоровенко, В.В. Гончарук, 2015

Известно [3,4], что в питьевой водопроводной воде, системах ее очистки и водораспределения существует большое разнообразие микробных фило типов. Молекулярные методы показали, что в хлорированной питьевой воде доминируют *Proteobacteria*, особенно классов *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* и *Gammaproteobacteria*.

В [5] исследована микрофлора общественных питьевых водопроводных вод из семнадцати различных городов между истоками р. Арканзас и устьем р. Миссисипи. Почти 98% последовательностей, наблюдаемых среди всех систем, разделились на пять филумов: *Proteobacteria* (35%), *Cyanobacteria* (29%), *Actinobacteria* (24%, из которых 85% *Mycobacterium spp.*), *Firmicutes* (6%) и *Bacteroidetes* (3,4%). В [6] была исследована также динамика бактериальных сообществ каждого этапа очистки питьевой воды на сооружениях водоподготовки в Китае. Доминирующим филумом, с точки зрения среднего изобилия, во всех образцах являлся *Proteobacteria* (47,1%), затем *Bacteroidetes* (12,1%), *Actinobacteria* (11,2%), *Cyanobacteria* (10,7%) и *Chloroflexi* (5,8%), в то время как *Firmicutes*, *Acidobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, *Thermotogae* и *Verrucomicrobia* представлены в незначительном количестве. При анализе микрофлоры биопленок и воды на разных этапах очистки выявлены различия в бактериальном составе биопленки и пробах воды, хотя в двух образцах преобладали *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* и *Actinobacteria*. Предыдущие исследования [7 – 9] показали, что эти группы широко распространены в пресноводных средах обитания. Данный результат также свидетельствует о том, что происходит динамический обмен между бактериями биопленки и бактериями из соответствующих образцов воды [10]. Кроме того, в работах [3, 4, 11] отмечено доминирование филума *Proteobacteria* как в природной, так и в хлорированной питьевых водах. Таким образом, фило типы из *Proteobacteria* составляют значительную часть микробной флоры, которая присутствует в хлорированной питьевой воде.

Тот факт, что бактериальный состав биопленки все же отличается от микрофлоры воды, может быть связан с тем, что образование биопленки не просто отражает основные бактериальные сообщества изучаемой воды, но они могут спонтанно формироваться в соответствии с условиями окружающей среды [12, 13].

Отдельные бактериальные сообщества были обнаружены на всех этапах системы водоподготовки. Вполне вероятно, что конкретные операции, используемые в системах подготовки питьевой воды,

по-разному влияют на бактериальный состав [14, 15]. В целом, детальный анализ динамики бактериальных сообществ всего процесса водоподготовки показал, что фильтрование через песчаный фильтр и хлорирование были самыми эффективными в снижении разнообразия водных и биопленочных сообществ [14 – 16].

В [17] установлено, что микробное разнообразие очищенной воды определяется влиянием процессов водоподготовки. В природной воде наблюдались филумы *Beta*- и *Gamma*proteobacteria, тогда как в очищенной питьевой воде – *Alphaproteobacteria*. Функциональный анализ показал, что основные метаболические функции микроорганизмов питьевой воды не варьировались. Однако было отмечено значительное увеличение защитных функций, а именно синтез генов глутатиона при окислительном стрессе и активация систем детоксификации, что проявлялось выживанием бактерий питьевой воды, которые, вероятно, также могут быть более устойчивы к хлору.

В [18, 19] сформулирована гипотеза хлоррезистентности бактерий, согласно которой заключительным звеном формирования резистентности бактерий к хлору как биоциду является биопленка. В ней происходит горизонтальная передача генов резистентности даже между неродственными клетками. Гены повышенной устойчивости к хлору могут также передаваться биопленками систем водоснабжения [20].

По мнению авторов [21], проблема адаптивной мультирезистентности бактерий к хлору как дезинфектанту тесно связана с гормезисом [22].

В [21] выдвинута гипотеза о связи резистентности и гормезиса, суть которой в том, что хлор и его соединения (как основные средства обеззараживания воды во всем мире) вносят определенный вклад в стойкость водной микробиоты. Так как хлор в остаточных концентрациях проявляет горметическое стимулирующее действие на рост бактерий, это гипотетически является фактором, влияющим на стабильность их циркуляции в водной среде и питьевой воде.

Авторами [5, 6, 8] были обнаружены общие сходства среди микробного разнообразия многочисленных систем водоподготовки. Это свидетельствует о том, что дезинфекция и распределительные системы воды имеют большее влияние на микрофлору в пунктах использования, чем географическое расположение, качество или тип исходной воды. Таким образом, сходство базовой микрофлоры систем предполагает, что системы водоочистки и распределения питьевой воды являются селективными средами для определенного вида микробиоценоза.

Цель данной работы – выделение индивидуальных культур бактерий из питьевой водопроводной воды и проб этой же воды, отобранной на различных этапах ее доочистки; изучение их культурально-морфологических свойств, устойчивости по отношению к NaOCl как основному средству обеззараживания воды; определение видового состава исследуемых микроорганизмов по последовательностям гена 16S рРНК с использованием методов молекулярной биологии на основе филогенетического анализа.

Методика эксперимента. Исследовали пробы питьевой водопроводной воды, а также пробы этой же воды, отобранной на различных этапах ее очистки с помощью установки водоподготовки предприятия специальных напитков. Вода, которая прошла все стадии подготовки и доочистки, является исходным сырьем при производстве специальных напитков. В систему водоподготовки она поступала из городского водопровода и соответствовала нормативным требованиям к питьевой воде (ДСанПиН 2.2.4-400-10 [23]). С целью доочистки ее пропускали через систему очистительных устройств, состоящих из резервуаров-накопителей водопроводной воды, песчаных фильтров, угольных фильтров, дегазатора, буферных резервуаров очищенной воды. Для предупреждения развития нежелательной микрофлоры в технологии водоподготовки предусмотрено обеззараживание воды и дезинфекция оборудования, которые проводят в трех точках: резервуарах-накопителях, перед песчаными фильтрами и в буферных резервуарах. Обеззараживание осуществляли гипохлоритом натрия (NaOCl). Считается, что одним из наиболее эффективных средств по удалению биопленки является раствор NaOCl, который способен растворять органический экстрацеллюлярный матрикс биопленки, проникая в глубокие слои бактериальных конгломератов [24]. Дозы NaOCl составляли: в точке 1 – в количестве, необходимом для обеспечения концентрации свободного хлора на уровне 0,4 – 0,5 мг/дм³; в точке 2 – доведение концентрации свободного хлора до 0,9 мг/дм³; в точке 3 – обеспечение остаточной концентрации свободного хлора 0,04 мг/дм³. Дезинфекцию оборудования проводили 2%-ным раствором гипохлорита натрия.

Исследуемые образцы воды были стерильно отобраны со следующих этапов очистки: питьевая вода из городского водопровода; вода из накопительных резервуаров; вода после песчаного, угольного и Н-катионных фильтров; вода после дегазатора; очищенная вода из буферных резервуаров. Бактерии выделяли методом мембранного фильтрования. По 100 см³

исследуемой воды фильтровали через стерильные фильтры EZPAK036, которые помещали на чашки Петри с мясо-пептонным агаром (МПА); инкубировали при $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (48 ± 2) ч. Для получения изолированных колоний чистых культур выделенных микроорганизмов использовали метод секторного посева по Gold [25]. Характер роста последних изучали на жидкой (мясо-пептонный бульон (МПБ)) и твердой (мясо-пептонный агар (МПА)) питательных средах.

Далее определяли устойчивость выделенных нами чистых культур бактерий по отношению к хлору. Показатель устойчивости к хлору микроорганизмов, которые колонизируют системы питьевой воды, является важным для оценки качества получаемой воды. При проведении анализа использовали суточные культуры бактерий. Микробную массу смывали 50 см^3 стерильной питьевой водопроводной воды, используемой на производстве для доочистки. Смывы встряхивали на аппарате Шуттеля в течение 30 – 40 мин. Полученную однородную микробную суспензию стандартизировали по стандарту мутности до 5 единиц ($0,5$ млрд/ 1 см^3). Далее готовили серию разведений и доводили плотность исследуемой суспензии микробных клеток до $5 \cdot 10^4/\text{см}^3$ (оптимальная плотность суспензии микробных клеток для визуального подсчета колонийобразующих единиц (КОЕ)). В качестве контроля $0,1\text{ см}^3$ каждой разведенной микробной суспензии сеяли на чашки Петри с МПА (поверхностный метод), инкубировали при $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (48 ± 2) ч. Для определения устойчивости к хлору к 1 см^3 каждой разведенной микробной суспензии добавляли раствор NaOCl в следующих концентрациях: 1,4; 3; 5; 7 мг/ дм^3 . Инкубировали в течение 5; 10; 20 и 60 мин при $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$. Через двое суток подсчитывали КОЕ, сравнивая количество выживших бактериальных клеток с контролем, а также рассчитывали количество бактерий чувствительных и нечувствительных по отношению к хлору.

С использованием методов молекулярной биологии на основе филогенетического анализа определили таксономический статус исследуемых микроорганизмов по последовательностям гена 16S рРНК.

Генетическую идентификацию проводили в несколько этапов: выделение ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР) гена 16S рРНК, секвенирование ПЦР-продуктов, анализ последовательностей 16S рРНК.

Выделение ДНК из биомассы бактерий. Проводили с использованием метода, описанного в [26]. При этом концентрация полученного препарата ДНК составляла 30 – 50 мкг/ см^3 . Согласно данным электро-

форетического анализа РНК в полученном препарате присутствует в следовых количествах (< 1%).

ПЦР гена 16S рРНК. При проведении полимеразной цепной реакции и дальнейшего секвенирования ПЦР-фрагментов гена 16S рРНК использовали универсальную праймерную систему [27]. Объем амплификационной смеси составлял $50 \cdot 10^{-6}$ дм³ и имел следующий состав: 1х буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ (NH₄)₂SO₄, 67 мМ трис-НСl, рН 8,8, 2 мМ MgCl₂); по 12,5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы BioTaq ("Диалат ЛТД", Россия).

Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл – 94°С при 9 мин, 55°С при 1 мин, 72°С при 2 мин; последующие 30 циклов – 94°С при 1 мин, 55°С при 1 мин, 72°С при 2 мин; завершающий цикл – 72°С при 7 мин. Продукты ПЦР анализировали при помощи электрофореза в 2%-ном геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см.

Выделение и очистку продуктов ПЦР проводили из легкоплавкой агарозы с применением набора реактивов Wizard PCR Preps ("Promega", США) согласно рекомендациям производителя.

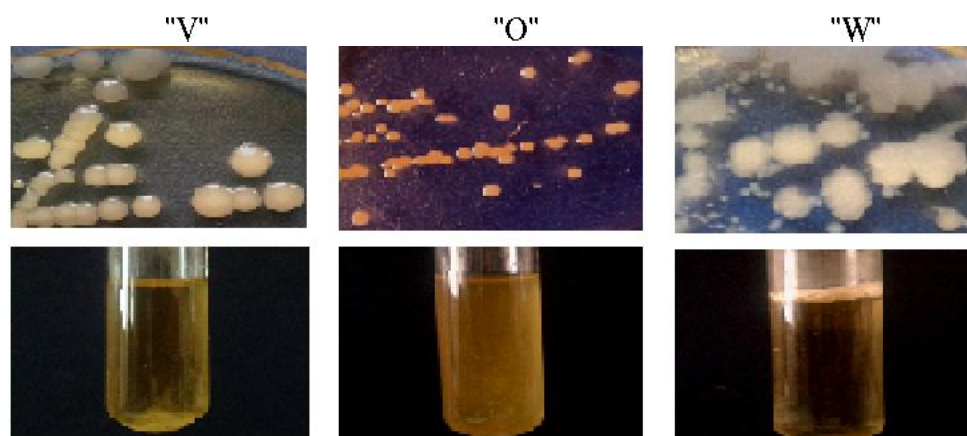
Секвенирование ПЦР-продуктов. Полученные ПЦР-фрагменты генов, кодирующих 16S рРНК, секвенировали по методу, описанному в [28], с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 ("Applied Biosystems", Inc., USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 ("Applied Biosystems", Inc., USA) согласно инструкциям производителя. При этом для секвенирования использовали праймеры [29] и чтение проводили в двух направлениях.

Анализ последовательностей 16S рРНК. Первичный анализ сходства нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК изучаемых штаммов проводили с помощью программного пакета BLAST [29].

Результаты и их обсуждение. Получены изоляты культур микроорганизмов из различных типов колоний, выявленных в пробах воды методом мембранного фильтрования. Культуры были обозначены "V", "O", "W" (рисунок).

Как видно из указанного рисунка, бактериальные культуры "V", "O" представлены колониями S-типа. Изолят "W" имеет неправильную форму, ругозный тип поверхности, более крупные размеры, что характерно для бактерий, способных формировать биопленку.

При изучении характера роста бактерий на жидкой питательной среде обнаружено, что только культура "W" образует плотную морщинистую пленку в интерфазе жидкость/воздух. Это, согласно [30, 31], может свидетельствовать о способности бактерии формировать фиксированную на поверхности биопленку.



Особенности роста выделенных бактериальных изолятов на плотной и жидкой питательных средах.

При изучении чувствительности выделенных бактерий к NaOCl выявлено, что их выживаемость варьирует в диапазоне 0,18 – 98% (таблица). Наиболее резистентными к хлору оказались бактерии "W", их устойчивость к NaOCl при концентрациях 1,4; 3; 5 и 7 мг/дм³ варьирует в диапазоне 1 – 98% при продолжительности экспозиции от 5 до 60 мин, в то время как изоляты "V" и "O" продемонстрировали низкую выживаемость в присутствии гипохлорита натрия (0 – 16%). Установлено, что ругозность бактериальных колоний связана с более высокой их выживаемостью в хлорированной воде по сравнению с гладкими формами бактерий и коррелирует со способностью формировать биопленку [32, 33]. На основании полученных данных можно провести определенную параллель между морфологическим типом колоний бактериальных изолятов "V", "O", "W", их способностью образовывать пелликулу в интерфазе жидкость/воздух и устойчивостью к хлору. Среди изученных нами культур только изолят "W" образовывал плотную хорошо структурированную пелликулу, что характерно для бактерий, способных формировать биопленку, и показал высокую

резистентность по отношению к хлору. Как видно из таблицы, изолят "W" проявлял заметную устойчивость (1 – 84%) даже при таких высоких значениях концентрации NaOCl, как 5 и 7 мг/дм³, что можно объяснить исходя из концепции [18, 19, 21], которая поясняет единство природы резистентности и важности воды как идеальной среды для формирования биопленки, обеспечивающей персистенцию и мультивариантность резистентности бактерий.

Из вышеизложенного можно сделать предположение, что выделенный нами изолят "W", который проявил самую высокую устойчивость к хлору, подвергся большей стимуляции биологических показателей (гормезису) гипохлоритом натрия по сравнению с другими микроорганизмами. Принимая во внимание тот факт, что данные бактерии прошли все стадии очистки установки водоподготовки и трижды подвергались действию хлора, выбранные для исследования концентрации NaOCl уже не являлись ингибирующими для изолята "W" и не проявляли в полной мере бактерицидного действия.

Исследованная в данной работе проблема резистентности бактерий к хлору как основному средству обеззараживания воды, которую мы попытались охарактеризовать, имеет конкретную прикладную направленность. Решение этого вопроса может быть основанием необходимости использования более эффективных технологий обеззараживания воды и/или комбинирования хлора с другими дезинфектантами.

Проведена генетическая идентификация бактериальных культур "V", "O", "W". Для всех изучаемых образцов определена практически полная последовательность нуклеотидов амплификата гена, кодирующего 16S рРНК по номенклатуре *Escherichia coli*. Для бактериального изолята "O" была определена практически полная последовательность (1495 нуклеотидов) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК, что соответствует позициям с 16 по 1517. Далее были проанализированы полученные последовательности путем сравнения с аналогичными в базе данных GenBank [29].

Следует отметить, что филогенетически наиболее близкими к образцу "O" являлись *Bacillus nanhaiensis* и *Bacillus arsenicus*. Уровень сходства последовательностей исследуемого образца со штаммами *Bacillus nanhaiensis* strain K-W9 (JQ799063) и *Bacillus arsenicus* strain B3 (GQ304784) составил соответственно 100 и 99,9%. Уровень сходства с типовым штаммом *Bacillus nanhaiensis* strain JSM 082006 (GU477780) составил 100, а уровень сходства с типовым штаммом *Bacillus arsenicus* strain cop a/3 (AJ606700) – 97,4%.

Чувствительность выделенных бактериальных культур по отношению к хлору

Культура	Доза NaOCl, мг/дм ³	Продолжительность экспозиции с NaOCl, мин									
		5		10		20		60			
		Количество бактерий, %									
		чувствительных к NaOCl	чувствительных к NaOCl	нечувствительных к NaOCl	чувствительных к NaOCl	чувствительных к NaOCl	нечувствительных к NaOCl	чувствительных к NaOCl	чувствительных к NaOCl	нечувствительных к NaOCl	чувствительных к NaOCl
"V"	1,4	16	84	12	88	10	100	10	88	11	89
	3	2	98	0	100	0	100	0	100	1	99
	5	4	96	4	96	1	99	1	99	2	98
	7	4	96	0	100	1	99	1	99	1	99
"O"	1,4	13,50	86,5	8,7	91,3	0	100	0	100	0	100
	3	7,46	92,54	5,15	94,85	0	100	0	100	0	100
	5	0,18	99,82	5,33	94,67	0	100	0	100	0,18	99,82
	7	4,80	95,2	0,53	99,47	0	100	0	100	0	100
"W"	1,4	-	-	85	15	96	4	96	4	78	22
	3	24	76	81	19	98	2	98	2	3	97
	5	84	16	74	26	46	54	46	54	1	99
	7	72	28	68	32	39	61	39	61	4	96

По данным [34], обнаруженный уровень сходства последовательностей 16S рРНК позволяет отнести изучаемый штамм "O" к виду *Bacillus nanhaiensis*.

Для штамма "V" определена последовательность (1439 нуклеотидов) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК, что соответствует позициям с 40 по 1490. Кроме того, был проведен анализ полученной последовательности путем сравнения с таковыми, помещенными в базу данных GenBank [29]. Выявлено, что филогенетически наиболее близкими к образцу "V" являлись виды бактерий [*Brevibacterium*] *frigoritolerans*, *Bacillus simplex* и *Bacillus megaterium*. Уровень сходства последовательностей исследуемого образца со штаммами [*Brevibacterium*] *frigoritolerans* strain DSM 8801 (NR_042639), *Bacillus simplex* strain WN579 (DQ275178) и *Bacillus megaterium* strain NBRC 12068 (AB680229) составил соответственно 100; 100 и 99,9%. Уровень сходства последовательностей бактериального изолята "V" с типовыми штаммами [*Brevibacterium*] *frigoritolerans* strain 8801T (AM747813), *Bacillus simplex* strain DSM 1321T (AJ439078) и *Bacillus megaterium* strain IAM 13418 (D16273) составил соответственно 100; 99,5 и 94,8%. Обнаруженный уровень сходства последовательностей 16S рРНК позволяет отнести бактериальную культуру "V" к штамму вида [*Brevibacterium*] *frigoritolerans* [34].

Для образца "W", который показал высокую устойчивость к концентрациям NaOCl – 1,4; 3; 5 и 7 мг/дм³ в пределах 1 – 98%, также была определена практически полная последовательность (1493 нуклеотида) амплификата гена, кодирующего 16S рРНК, что соответствует позициям с 20 по 1518. Проведен анализ указанной последовательности путем сравнения с таковыми, помещенными в базу данных GenBank [29].

Из полученных данных следует, что филогенетически наиболее близкими к образцу "W" были виды бактерий *Lysinibacillus fusiformis* и *Lysinibacillus sphaericus*. Уровень сходства последовательностей данного образца со штаммами *Lysinibacillus fusiformis* strain DSM 2898 (NR_042072) и *Lysinibacillus sphaericus* strain SEP-1 (KF228905) составил соответственно 100 и 99,8%. Уровень сходства последовательностей образца "W" и типового штамма *Lysinibacillus fusiformis* strain NRS-350 (AF169537) составил 99,7, а уровень сходства с типовым штаммом *Lysinibacillus sphaericus* strain B-23268 (AF169495) – 98,4%. Согласно [34] обнаруженный уровень сходства последовательностей 16S рРНК позволяет отнести образец "W" к виду *Lysinibacillus fusiformis*.

Детальная характеристика идентифицированных бактериальных культур описана в [35].

Выводы. Изучены морфолого-культуральные особенности трех доминирующих бактериальных культур, изолированных из питьевой водопроводной воды и этой же воды, отобранной на различных этапах ее доочистки на установке водоподготовки предприятия специальных напитков. Проанализирован видовой состав выделенных бактериальных изолятов по последовательностям гена 16S рРНК. Идентифицированы следующие виды бактерий: *Bacillus nanhaiensis*, *Brevibacterium frigoritolerans* и *Lysinibacillus fusiformis*. Установлено, что наиболее резистентным к хлору оказался *Lysinibacillus fusiformis*; его устойчивость к NaOCl при концентрациях 1,4; 3; 5 и 7 мг/дм³ варьирует в пределах 1 – 98% при продолжительности экспозиции от 5 до 60 мин, в то время как остальные два изолята *Bacillus nanhaiensis* и *Brevibacterium frigoritolerans* продемонстрировали низкую выживаемость в присутствии NaOCl (0 – 16%). Проведена параллель между морфологическим типом бактериальных изолятов, их способностью образовывать пелликулу в интерфазе жидкость/воздух и устойчивостью к хлору. Выявлено, что стойкость к достаточно высоким концентрациям NaOCl можно пояснить гипотезой о связи резистентности и гормезиса.

Резюме. Вивчені морфолого-культуральні особливості трьох домінуючих бактеріальних культур, ізольованих із питної водопровідної води та проб води, відібраної на різних етапах її доочистки на установці водопідготовки спеціальних напоїв. Проаналізовано видовий склад виділених бактеріальних ізолятів за послідовностями гена 16S рРНК. Ідентифіковані наступні види бактерій: *Bacillus nanhaiensis*, *Brevibacterium frigoritolerans* та *Lysinibacillus fusiformis*. Встановлено, що найбільш резистентним до хлору виявився *Lysinibacillus fusiformis*. Його стійкість до NaOCl при концентраціях 1,4; 3; 5 і 7 мг / дм³ варіює в межах 1 – 98%, при тривалості експозиції від 5 до 60 хв, у той час як інші два ізоляти *Bacillus nanhaiensis* та *Brevibacterium frigoritolerans* продемонстрували низьку життєву активність у присутності NaOCl (0 – 16%).

DETERMINING THE SPECIES COMPOSITION OF MICROBIAL WATER THAT ARE RESISTANT TO CHLORINE COMPOUNDS

Summary

Studied the morphological-cultural features of the three dominant bacterial cultures isolated from a drinking water tap and water samples taken at various stages treatment at the water treatment plant enterprises special drinks. Analyzed the species composition of selected bacterial isolates by 16S rRNA gene sequences. Identified the following types of bacteria: *Bacillus nanhaiensis*, *Brevibacterium frigoritolerans* and *Lysinibacillus fusiformis*. Found that the most resistant to chlorine was *Lysinibacillus fusiformis*. Its resistance to NaOCl at concentrations of 1,4; 3; 5 and 7 mg/dm³ varies in the range from 1 to 98 %, with duration of exposure from 5 to 60 min, while the remaining two isolates of *Bacillus nanhaiensis* and *Brevibacterium frigoritolerans* showed low survival rate in the presence of NaOCl (0 – 16%).

Список использованной литературы

- [1] Tetz V.V. // Med. Microbiol. Lett. – 1996. – 5. – P. 426 – 436.
- [2] Wolcott R.D., Ehrlich G.D. // J. Amer. Med. Assoc. – 2008. – 299. – P. 2682 – 2684.
- [3] Hoefel D., Monis P., Grooby W. et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – 71, N11. – P. 6479 – 6488.
- [4] Eichler S., Christen R., Holtje C. et al. // Ibid. – 2006. – 72, N3. – P. 1858 – 1872.
- [5] Holingre E., Ross K., Robertson C. et al. // Water Res. – 2014. – 49. – P. 225 – 235.
- [6] Wenfang L., Zhisheng Y., Hongxun Z. et al. // Ibid. – 2014. – 52. – P. 218 – 230.
- [7] Poitelona J-B., Joyeux M. // Ibid. – 2009. – 43. – P. 4197 – 4206.
- [8] Revetta R., Pemberton A., Lamendella R. et al. // Ibid. – 2010. – 44. – P. 1353 – 1360.
- [9] Williams M., Domingo J., Meckes M. et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – 9, N5. – P. 954 – 964.
- [10] Martiny A.C., Albrechtsen H.-J., Arvin E. et al. // Ibid. – 2005. – 71. – P. 8611 – 8617.
- [11] Williams M., Braun-Howland E. // Ibid. – 2003. – 69, N9. – P. 5463 – 5471.

- [12] *Besemer K., Peter H., Logue J. et al.* // *Isme J.* – 2012. – **6**, N8. – P. 1459 – 1468.
- [13] *Henne K., Kahlisch L., Brettar I. et al.* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. – **78**, N10. – P. 3530 – 3538.
- [14] *Kwon S., Moon E.* // *Microbiol. Environ.* – 2009. – **26**, N10. – P. 149 – 155.
- [15] *Pinto A., Xi C., Raskin N.* // *Environ. Sci. Technol.* – 2012. – **46**, N16. – P. 8851 – 8859.
- [16] *Kormas K.* // *Environ. Monitor. Asses.* – 2010. – **165**, N1. – P. 27 – 38.
- [17] *Chao Y.* // *Scientific Report.* – 2013. – **3**. – P.3550.
- [18] *Мокієнко А.В., Петренко Н.Ф.* // *Вісн. НАН України.* – 2010. – №8. – С. 49 – 56.
- [19] *Мокієнко А. В., Петренко Н. Ф., Гоженко А. И.* // *Гігієна населених місць.* – 2011. – №57. – С. 120 – 127.
- [20] *Heineman J.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – **96**. – P. 169 – 186.
- [21] *Мокієнко А.В.* // *Вісн. НАН України.* – 2012. – №11. – С. 32 – 39.
- [22] *Calabrese E.* // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2005. – **202**, N3. – P. 289 – 301.
- [23] *ДСанПіН 2.2.4-400-10.* Гігієнічні вимоги до води питної, призначеної для споживання людиною. – Введ. 12.05.10.
- [24] *Berber V.B., Gomes B.P.* // *Int. Endod. J.* – 2006. – **39**, N1. – P. 10 – 17.
- [25] *Микробиологическая диагностика дисбактериозов: Метод. рекомендации.* – К., 1986. – 27 с.
- [26] *Бульгина Е.* // *Микробиология.* – 2002. – **71**, №4. – С. 500 – 508.
- [27] *Lane D.J.* 16S/23S rRNA sequencing / Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. – Chichester: John Wiley and Sons, 1991. – P. 115 – 175.
- [28] *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1977. – **84**. – P. 5463 – 5467.
- [29] *Camacho C.* // *BMC Bioinform.* – 2009. – **10**. – P. 421.
- [30] *Friedman L., Kolter R.* // *Molec. Microbiol.* – 2004. – **51**, N3. – P. 675 – 690.
- [31] *Fitnat H.* // *Microbiology.* – 1999. – **96**. – P. 4028 – 4033.
- [32] *Rice E.* // *Int. J. Environ. Health. Res.* – 1993. – **3**. – P. 89 – 98.
- [33] *Morris J.* // *J. Infect. Dis.* – 1996. – **174**. – P. 1364 – 1368.
- [34] *Stackebrandt E., Ebers J.* // *Microbiol. Today.* – 2006. – **33**. – P. 152 – 155.
- [35] *Roi I.Yu., Klymenko N.A., Zdorovenko G.M., Goncharuk V.V.* // *J. Water Chem. and Technol.* – 2014. – **36**, N4. – P. 184 – 189.

Поступила в редакцію 09.07.2014 г.