

**Министерство образования и науки РФ**  
**Федеральное государственное автономное образовательное учреждение**  
**высшего образования**  
**«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ**

**КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ**

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) – биология

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

Дипломная работа

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ БАКТЕРИЙ ИЗ  
ОБРАЗЦОВ ГРУНТА АНТАРКТИДЫ**

**Работа завершена:**

" \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2018 г. \_\_\_\_\_ (Л.Р.Хайбунасова)

**Работа допущена к защите:**

Научный руководитель  
к. б. н., доцент

" \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2018 г. \_\_\_\_\_ (А.М. Марданова)

Заведующий кафедрой  
д. б. н., профессор

" \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2018 г. \_\_\_\_\_ (О.Н. Ильинская)

Казань–2018

<b>СОДЕРЖАНИЕ</b>	стр
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b>	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	7
1.1 Значение мониторинга окружающей среды	7
1.1.1 Роль микробиологического мониторинга Антарктиды в изучении изменений климата Земли	8
1.2 Особенности Антарктиды как экологической системы	10
1.3. Механизмы адаптации микроорганизмов к низким температурам в Антарктиде	11
1.4 Бактериальное разнообразие Антарктики	12
1.5 Санитарно-эпидемиологический мониторинг на территории Антарктиды	16
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b>	21
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b>	21
2.1 Выделение и культивирование штаммов бактерий	21
2.2 Идентификация культур	23
2.2.1 Метод Масс-Спектрометрии	23
2.2.2 Молекулярно-генетическая идентификация бактерий	23
2.3 Выделение ДНК	24
2.4 Реакция амплификации	24
2.5 Электрофорез в агарозном геле	25
2.6 Секвенирование и анализ 16S рРНК	25
2.7 Определение чувствительности к антибиотикам	25
2.8 Характеристика адгезивности штаммов <i>Streptococcus pneumoniae</i>	26
2.9 Статобработка	26
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	27
3.1 Выделение и характеристика изолятов из различных образцов антарктического грунта и культуральные признаки выделенных штаммов	27
3.2 Идентификация изолятов с помощью Масс-Спектрометрии	32

3.3 Молекулярно-генетическая идентификация изолятов бактерий, выделенных из грунтов Антарктиды	35
3.4 Определение чувствительности к антибиотикам некоторых изолятов бактерий	36
3.5 Сравнительный анализ адгезии штаммов <i>Streptococcus pneumoniae</i> , выделенных от больных и из внешней среды	37
<b>ВЫВОДЫ</b>	40
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	41

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

РАЭ – Российская Антарктическая экспедиция

ПЦР – полимеразная цепная реакция

NCBI – The National Center for Biotechnology Information (Национальный центр биотехнологической информации)

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool (Средство Поиска Основного Локального Выравнивания)

## ВВЕДЕНИЕ

Антарктида – это уникальное место на нашей планете с экстремальным климатом. Однако в последние десятилетия территория Антарктиды все больше изменяется под воздействием антропогенной деятельности. В последние годы Антарктида стала доступна и популярна среди туристов, что приводит к изменению аборигенной микрофлоры [Панин с соавт., 2015]. Известно, что экстремальный климат Антарктиды оказывает неблагоприятное воздействие на устойчивость иммунитета человека к различным бактериальным инфекциям. Особенно хорошо это выражено во время полярной ночи, когда имеет место быть серьезный дефицит ультрафиолета и витаминов. Существуют исследования, показывающие снижение иммуноглобулинов в крови и ослабление активности иммунных клеток у полярников. Описаны случаи выделения условно-патогенных микроорганизмов из окружающей среды Антарктиды [Горбунов с соавт., 2009]. На станции «Новолазаревская» описывается вспышка диареи у сотрудников, зимовавших на тот момент там. Возбудителя инфекции удалось идентифицировать, это оказались представители рода *Klebsiella*. Важнейшей целью является идентификация микроорганизма с определением и изучением источников заражения. Психротрофные микроорганизмы вполне могут вызывать природно-очаговые инфекции. К ним относят такие роды как *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Listeria* и *Yersinia*. Поэтому так важно изучать эпидемиологические аспекты, источники и резервуары возбудителей [Сбойчаков с соавт., 2014].

Исследования микрофлоры Антарктиды начались относительно недавно: в 1955 году была произведена первая антарктическая экспедиция, что можно назвать началом микробиологического мониторинга. С тех пор экспедиции на Антарктиду проводятся регулярно и ведется забор проб для анализа микробиологического состава грунта, воды и воздуха [Покровский, 1994].

Изучение микробиологических проб позволяет не только выявить новые психрофильные и патогенные штаммы бактерий и, в перспективе, улучшить санитарно-эпидемиологический контроль на базах, но также проследить за изменением скорости распространения бактерий и их устойчивости к факторам внешней среды. Также микробиологический мониторинг может предсказывать изменения в окружающей среде из-за глобального потепления, так как микроорганизмы первыми реагируют на изменение климата. Поскольку такие факторы как температура и влажность окружающей среды влияют на рост и размножение микроорганизмов, их изменения могут быть использованы в прогностических целях микробиологического мониторинга [Panin *et al.*, 2013].

**Целью** работы является выделение и характеристика патогенных и условно-патогенных бактерий в образцах грунта на территории Российских полярных станций в Антарктиде.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- 1) Выделение изолятов из различных образцов антарктического грунта и их характеристика.
- 2) Идентификация выделенных штаммов с помощью технологии Maldi-tof и секвенирования 16S рРНК.
- 3) Исследование на чувствительность к антибиотикам изолятов бактерий.
- 4) Сравнительный анализ адгезии штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных и из внешней среды.

## 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Значение мониторинга окружающей среды

Термин «мониторинг» впервые был введен вместе с идеей глобального мониторинга природной среды человека, в период организации конференции ООН по окружающей среде в Стокгольме, в 1972 г.

В 1973 г. канадский ученый Р. Мэнн предложил называть «мониторингом», «...систему повторных наблюдений за одним или несколькими объектами окружающей среды в пространстве и во времени с конкретными целями в соответствии с предварительно разработанной программой» [Одум, 1986; Израэль, 1984]. В 1978 г. английским биологом Д. М. Эллауэллом было сформулировано еще одно определение «мониторинга», как «...процесс регулярного сбора информационных данных о свойствах и параметрах сложного объекта для определения тенденций изменения свойств и параметров» [Hellawell, 1978]. При этом все авторы среди основных целей мониторинга наиболее важной составляющей выделяют использование полученных результатов для прогнозирования будущих процессов. Вместе с тем, все авторы определений выделяют наиболее важную цель «мониторинга», это анализ и использование полученных данных для предсказания будущих процессов.

Мониторинг является результатом объединения научной дисциплины, изучающей подробные свойства и параметры предмета исследования, с моделированием предполагаемых процессов и математическим анализом. Мониторинг давно уже является неотъемлемой составляющей частью таких наук как: Экологии, Эпидемиологии, Микробиологии, а так же других наук [Арский с соавт., 1992].

Развитие современных информационных технологий позволяет контролировать распространение патогенов, прогнозировать развитие эпидемических процессов и проводить комплексное изучение показателей заболеваемости населения. Качество мониторинга в значительной степени зависит от эффективности используемых для этой цели информационных

технологий, позволяющих использовать обширную информационную базу [Воронцов с соавт., 2006; Есипов с соавт., 2011].

С помощью данных технологий, появилась возможность для специалистов из разных профилей приобретать важную информацию о взаимодействии различных компонентов полученных баз данных. Скорость обработки различных массивов баз данных, удобство скопления всей информации на одном рабочем месте, возможность визуализации данных исследуемого процесса в динамике, надежность и достоверность благодаря использованию современного математического и статистического оборудования, в добавок возможность прогнозирования процесса делают мониторинговые технологии незаменимыми [Андрюков с соавт., 2011; Boller *et al.*, 2009; Edwards, 1999].

1.1.1 Роль микробиологического мониторинга Антарктиды в изучении изменений климата Земли

Одними из первых на изменение климата земли реагируют микроорганизмы, которые как индикаторы сигнализируют о малейшем изменении в окружающей среде [Roma *et al.*, 2012]. Такие данные как появление новых микроорганизмов, изменение патогенности и контагиозности подвергаются анализу. Данные изменения легко проследить в пустынной местности оазисов Антарктиды, которые занимают примерно около 2% от всей площади этого континента. Поскольку такие факторы как температура и влажность окружающей среды влияют на рост и размножение микроорганизмов, их изменения могут быть использованы в прогностических целях микробиологического мониторинга [Panin *et al.*, 2013].

Микробиологический мониторинг (ММ) – это систематический эпидемиологический надзор, с помощью которого можно обнаружить болезнетворных микроорганизмов, а также предсказать их появление, что позволяет вовремя предотвратить эпидемии. В связи с изменением климата изменяются и расширяются ареалы обитания патогенных микроорганизмов,



что может привести к вспышкам эпидемий и возникновению заболеваний ранее не свойственных для определённых регионов. Территория Антарктиды все больше изменяется под воздействием антропогенной деятельности. В последние годы Антарктида стала доступна и популярна среди туристов, что приводит к изменению аборигенной микрофлоры [Панин с соавт., 2015].

Климат полярных зон изменяется на более теплый, с каждым годом этот процесс происходит интенсивнее. В отчете всемирной метеорологической организации, говорится, что за последние двадцать лет скорость увеличения температуры возросла в три раза. Наиболее наглядные изменения произошли на территории Аляски, Арктики и Антарктиды. Геофизическая обсерватория РФ констатирует, что на планете увеличилась среднегодовая температура на  $0.8^{\circ}\text{C}$ . По последним подсчетам, температура в Арктике может к концу столетия увеличиться на  $7^{\circ}\text{C}$ . В связи с этим ВОЗ разработала специальную программу по оценке воздействия изменения климата на влияние здоровья населения планеты [Panin *et al.*, 2013].

Антарктические экосистемы систематически стали изучать только с 1996 г. (42-ой сезон Российской Антарктической экспедиции). Данные работы проводятся на территории антарктических поселений и сопровождаются санитарно-бактериологическими и химическими исследованиями воды, почвы, и представителей биосферы. Показано, что за последние 15 лет, с начала наблюдений, в местах, подвергшихся антропогенному изменению увеличилось количество микроорганизмов в грунте в 3 раза [Convey, 2005].

Из всего выше сказанного можно сделать вывод, что микробиологический мониторинг можно применять с целью предсказания негативных последствий глобального потепления климата планеты.

## 1.2 Особенности Антарктиды как экологической системы

Антарктида является самым южным континентом Земли. Антарктиду омывают три океана, это Атлантический, Индийский и Тихий океаны. Кроме того, Антарктида считается одной из самых холодных и сухих экосистем на Земле. Тем не менее в таких условиях могут выживать различные представители микроорганизмов [Singh *et al.*, 2007]. Наибольший процент обнаруженных микроорганизмов составляют прокариоты. В Антарктике практически отсутствует растительность, однако нередко можно обнаружить фотосинтезирующие бактерии или цианобактерии [Vincent, 1988; Gordon *et al.*, 2000; Brambilla *et al.*, 2001]. Данные микроорганизмы обеспечивают экосистему значительным количеством связанного углерода и азотом. Кроме того, цианобактерии характеризуются способностью фиксировать атмосферный азот [Vincent, 1988].

На развитие цианобактерий, стало быть, и на степень развития экосистем, в достаточной мере влияет наличие или отсутствие жидкой воды. Данное условие определяет свойства экосистемы Антарктики. В зависимости от степени доступности воды была предложена следующая классификация полярных местообитаний: три категории: водная (озерная), водно-наземные (болотная) и наземная [Elster, 2002]. В экосистеме Антарктики болото от озера отличается тем, что болото промерзает зимой, а озеро нет [Hawes *et al.*, 1992]. В водно-наземной среде жидкая вода доступна в течение лета. В наземных условиях вода доступна в жидкой форме только в течение короткого периода (например, таяние снега, дождь или снегопад), или только в виде пара в воздухе [Singh, Elster, 2007]. В Антарктике микроорганизмы могут быть подвержены разнообразным видам экологического стресса: высокая радиация, циклы оттаивания и замораживания, низкие температуры. Наиболее уязвимыми видами являются бактерии, населяющие пруды и ручьи. Однако озерные виды бактерий растут в условиях постоянного доступа воды и поэтому менее подвержены стрессовым факторам окружающей среды [Singh, Elster, 2007].

Таким образом, хоть Антарктида и является наиболее непригодным местом для жизни, прокариоты прекрасно приспособились к жизни на этом континенте.

### 1.3. Механизмы адаптации микроорганизмов к низким температурам в Антарктиде

Антарктические бактерии часто обнаруживаются внутри льда. Низкие температуры стимулируют выработку широкого спектра стратегий для смягчения воздействия окружающей среды [Vincent *et al.*, 1993]. Микроорганизмы в Антарктиде выработали множество механизмов адаптации к окружающей среде, то есть адаптации по отношению к низкой температуре, циклу замораживания/оттаивания, а также накопление света для фотосинтеза [Tang *et al.*, 1997]. Не все виды микроорганизмов, обитающих на территории Антарктики, являются истинными психрофилами, в большинстве случаев их классифицируют как психротрофные или психротолерантные, вследствие их способности к метаболизму при 0 °С, при этом температура оптимума роста у них выше 15 °С [Fritsen, Priscu, 1998]. Низкие температуры вызывают процесс индуцирования экспрессии специфических генов, продукты которых позволяют приспособиться к низким температурам и сохранить жизнеспособность организма [Los, Murata, 1999]. Благодаря содержанию в мембране этих бактерий полиненасыщенных жирных кислот сохраняется текучесть мембраны при экстремально низких температурах [Welsh, 2000]. Кроме того, психрофильным микроорганизмам необходимо адаптироваться к циклам замораживания и оттаивания. Значительная проблема для Антарктических микроорганизмов состоит в фазовом переходе жидкой H<sub>2</sub>O в состояние кристаллов льда. Формирование кристаллов льда внутри мембраны клеток приводит к физическим повреждениям и нарушениям целостности мембраны клетки [Vincent, 2007]. Кроме того, полярные бактерии выработали определенные механизмы для противостояния осмотическому шоку. Синтез экзополисахаридов – это один из важнейших механизмов, предотвращающий обезвоживание клетки и

предохраняющий от образования кристаллов льда внутри мембраны клетки [Wynn-Williams, 2000]. Синтез мукополисахаридов так же способствует выживанию в полярных условиях некоторых микроорганизмов: благодаря синтезу мукополисахаридов, кристаллы льда образуются вне клетки, а внутриклеточная жидкость становится более вязкой. Было установлено, что мукополисахариды играют важную роль в повышении выживаемости в условиях высушивания и замораживания [Tamaru *et al.*, 2005].

Более того, показано, что многие полярные микроорганизмы обладают способностью синтезировать определенные органические соединения, которые выполняют функцию криопротекторов [Fritsen *et al.*, 2000]. Например, данная функция была обнаружена у белка IBP, который так же обнаружен у эукариотических микроорганизмов *Melosira* и *Chlamydomonas* [Raymond, 2011]. Экспериментальным путем было доказано, что белок IBP повышает устойчивость к экстремально низким температурам, благодаря свойствам рекристаллизации [Raymond *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2006].

Также, к числу белков-криопротекторов, синтезируемых психрофильными микроорганизмами, относятся такие белки как INPs, обладающий ингибированием кристаллизации льда, и антифризовый белок-AFPs [Raymond *et al.*, 2007].

#### 1.4 Бактериальное разнообразие Антарктики

Антарктида – это чрезвычайно ветреное место. Было показано, что межконтинентальное движение воздушной массы на дальние расстояния обеспечивает распространение чужеродных микроорганизмов из Австралии, Южной Америки и Южной Африки, которые способны к достижению и потенциальному развитию в Антарктиде [Pearce *et al.*, 2009]. Локально величина и направление движения воздуха сильно различаются по территории Антарктики. Например, низколежащие прибрежные районы Антарктического континента и Антарктического полуострова периодически испытывают скоростные кatabатические ветры, которые могут приносить минеральную пыль из континентальных зон [Turner *et al.*, 2009; Pearce *et al.*,

2010]. Неясно позволяет ли такой перенос с полярного плато в прибрежную область сохранять жизнеспособность микроорганизмов, однако аналогичные воздушные движения были задокументированы в обратном траекторном анализе изученных микробиологических участков воздуха [Bottos *et al.*, 2014]. Кроме того, циркумполярные прибрежные ветры (циркулирующие с запада на восток) увеличивают смешение воздушных масс между внутренними и прибрежными районами и еще больше облегчают межрегиональное движение воздуха между различными районами в Антарктиде [Parish, Bromwich, 2007].

Достаточно мало исследований на сегодняшний день об аэриобиологических перемещениях микроорганизмов в Антарктику. Предполагается, однако, что перемещаться таким способом способно небольшое количество микроорганизмов [Hughes *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 2010; Bottos *et al.*, 2014]. Например, ДНК-последовательности морских микроорганизмов составляли <10% от разнообразия бактерий в воздухе, обнаруженного на исследовательской станции Галлея V на шельфе Бранта у основания моря Уэдделла и в точке Ротере, к западу от Антарктического полуострова. Отдельно, исследователи наблюдали небольшое перекрытие между аэрозольным и почвенным бактериальным разнообразием в сухих долинах Мак-Мердо [Bottos *et al.*, 2014].

В целом, в исследованиях, опубликованных в 2004-2014 годах, было мало сходства в разнообразии бактерий. Хотя это может быть последствием различий в методологиях, используемых в каждом исследовании, различия могут также вызываться экологическими стрессами, с которыми сталкиваются микроорганизмы при длительном переносе в воздухе [Hughes *et al.*, 2004; Pearce *et al.*, 2009]. Изменение микробиологического состава было также обнаружено при сравнении микробиоты образцов воздуха, собранных в непосредственной близости (например, ~ 2 км друг от друга), что также способствует сильному пространственному изменению антарктических аэрозолей. В воздухе были обнаружены микроорганизмы

таких родов как *Rubrobacter*, *Sphingomonas* и *Paenibacillus*. Представители этих родов достаточно часто обнаруживаются на территории Антарктиды [Pearce *et al.*, 2010; Bottos *et al.*, 2014].

Последние исследования, использующие молекулярные методы идентификации, показывают появление весьма специфических сообществ. Например, при анализе бактериальных культур, выделенных из девяти различных районов Антарктического полуострова, только 3.4% от общего количества изолятов были распространены достаточно часто [Peeters *et al.*, 2012]. Было установлено, что <1% бактерий от общего бактериального разнообразия способны культивироваться на средах [Hugenholtz, 2002]. В аналогичном отчете о структуре распределения бактерий, полученных без использования культивирования, сообщается, что в четырех холодных пустынных местообитаниях, расположенных в радиусе 80 км в сухих долинах Мак-Мердо, доля редких фило типов, характерных только для одного участка, составляла от 48 до 72% [Lee *et al.*, 2012].

На более высоких филогенетических уровнях, таких как тип или класс, в антарктических почвенных бактериальных сообществах обнаруживаются представители таких фил, как *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Bacteroidetes*, обнаруженных в почвенных экосистемах [Chong *et al.*, 2012]. Тем не менее, при сравнении различных антарктических регионов очевидны сильные различия в микробном составе. Например, в почве из районов Антарктического полуострова доминировали таксоны альфа-протеобактерий и *Actinobacteria*, и небольшое количество представителей таксона *Bacteroidetes*, однако в почве из гор Эльсуорта, наблюдалась обратная картина [Yergeau *et al.*, 2007]. Представители таксона *Actinobacteria* составляли наибольшую долю в общем почвенном бактериальном сообществе на Земле Виктории, что более чем в два раза больше, чем в других двух местах [Bottos *et al.*, 2014].

*Verrucomicrobia* и *Spirochaetes* являются редкими представителями, обнаруженными в ризосфере Антарктического полуострова, и они полностью

отсутствовали в минеральных почвах в Антарктических сухих долинах [Lee *et al.*, 2012].

Наиболее широко распространены на территории Антарктики представители рода *Pseudomonas*. Так, они составляют около 7% от общего микробного состава, обнаруженного в почве. Представители рода *Pseudomonas*, выделенные из ледника, обладали способностью синтезировать темно-коричневый пигмент. Так же на территории Антарктики были обнаружены мезофильные представители данного рода. Данная находка свидетельствует о том, что они, скорее всего, попали в Антарктику с помощью воздушных течений из более мягких по климату широт. Представители родов *Streptococcus*, *Micrococcus* и *Sarcina* часто обнаруживаются в молодых слоях ледника. Наиболее часто встречающиеся виды *Streptococcus albicans*, *Micrococcus roseus*, *Micrococcus albus* и *Sarcina lutea* [Teixeira *et al.*, 2010].

Последние данные литературы свидетельствуют о малом количественном содержании спорообразующих бактерий, обнаруженных в различных пробах Антарктиды. Это возможно из-за резко меняющихся погодных условий Антарктиды, так как из-за резкого дефицита влаги бактерии не успевают сформировать споры, что также ограничивает их размножение. Однако спорообразующие бактерии преобладают в количественном отношении в старейших слоях ледника. Спорообразующие микроорганизмы способны прекрасно восстанавливать свою жизнедеятельность после довольно долгого анабиотического состояния. Находясь в толще льда и при низких температурах, спорообразующие микроорганизмы хорошо и надежно предохраняются от различных стрессовых факторов и вредного воздействия окружающей среды. По мнению исследователей, спорообразующие микроорганизмы были занесены на территорию Антарктиды воздушными потоками еще до открытия Антарктиды и оставались замурованными в толще льда в состоянии анабиоза. Самая древняя спорообразующая бактерия была выделена из

ледника, находившегося на глубине более 2000 метров. Исследователи оценивают возраст этой бактерии примерно в 200000 лет [Pearce *et al.*, 2010].

### 1.5 Санитарно-эпидемиологический мониторинг на территории Антарктиды

Патогенные микроорганизмы на территории Антарктиды активно изучаются только последние 10 лет. Микробиологический мониторинг проводится с целью оценки динамики циркуляции микроорганизмов, ее влияния на эпидемиологический процесс, для прогнозирования развития, проведения и планирования профилактических мероприятий. Исследования проводятся на территориях прибрежных поселений РАЭ [Панин с соавт., 2013].

Исследования на территории прибрежных поселений Антарктиды природно-техногенных заболеваний с профилактическими целями инфекционных заболеваний полярников ранее были достаточно фрагментарными [Преображенская, 2009]. При антропогенном изменении среды распространяются возбудители, привнесенные из природной среды. Госпитальные условно-патогенные микроорганизмы представляют собой обычные обитателей почвы, растений и микрофлоры животных [Зуева, Яфаев, 2006]. Иммунитет полярников снижается из-за экстремальных природных условий, плохого питания и тяжелых работ. Так же среди полярников много людей довольно немолодого возраста, а снижение иммунитета чревато циркуляцией патогенов в замкнутом пространстве [Беляков, 1987].

На данный момент мало литературы, описывающей инфекционные заболевания полярников на территории Антарктиды. Описаны лишь в небольшом количестве исследования о выделении условно-патогенных микроорганизмов из окружающей среды [Горбунов с соавт., 2009]. Описана вспышка диареи у сотрудников, зимовавших на станции «Новолазаревская». Возбудителя инфекции удалось идентифицировать и это оказались представители рода *Klebsiella*.



Важнейшей целью санитарно-эпидемиологического мониторинга является идентификация микроорганизма с определением и изучением источников заражения. Известно, что психротрофные микроорганизмы вполне могут вызывать природно-очаговые инфекции. К ним относят такие роды как *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Listeria* и *Yersinia*. Поэтому так важно изучать эпидемиологические аспекты, источники и резервуары возбудителей [Сбойчаков с соавт., 2014].

Сапронозные микроорганизмы – это группа микроорганизмов, являющихся возбудителями различных заболеваний человека, естественной средой обитания которых служит абиотическая среда [Терских, 1958]. Впервые данный термин ввел профессор В.И. Терских (1958), он экспериментально обосновал роль внешней среды как естественной среды обитания патогенных микроорганизмов. Благодаря исследованию сапронозных микроорганизмов раскрылись многие экологические аспекты симбиотических отношений микроорганизмов. Сапронозные микроорганизмы прекрасно размножаются и продолжают свою жизнедеятельность при низких температурах, циклах замораживания и оттаивания, однако достаточно чувствительны к высушиванию [Белов, 2013]. Возможно многие микроорганизмы, для которых не характерно местообитание в условиях сурового климата Антарктиды, выживают в биопленках, которые прекрасно защищают микроорганизмы также от высушивания и низкой влажности [Сомова с соавт., 2009].

На данный момент известно, что патогенные микроорганизмы приспособились к суровым условиям полярного континента, хотя и уязвимы по отношению к высушиванию [Литвин, 1997]. В последнее время климат в полярных зонах планеты стал более благоприятным (из-за глобального потепления) для патогенных микроорганизмов, что может привести к распространению ареалов обитания и эпидемиям [Самышев, 2014].

С 1996 г. проводится ММ на территориях РАЭ. В ходе проведения исследований было установлено увеличение количества патогенных

микроорганизмов в 1.5-3.0 раза в единице объема грунта, вдобавок было отмечено видовое увеличение разнообразия патогенных микроорганизмов [Власов, 2012].

Прибрежные поселения РАЭ Антарктики находятся в изолированных и пустынных оазисах с редкими участками грунта свободных летом ото льда и снега. Строительство сооружений на толще льда заканчивались их погружением вглубь льда. По этой причине все постройки РАЭ располагаются на грунте [Долгих, 2014]. Большое количество инфекционных возбудителей обитает в почве и воде. Так же, по последним данным доказано, что не только теплокровные животные являются резервуарами для инфекционных возбудителей. Было обнаружено, что достаточно долгое время патогенные бактерии способны автономно существовать на различных субстратах окружающей среды [Шарапов, 1986]. Данное утверждение делает возможным считать любую экосистему очагом инфекционных заболеваний. Из всего сказанного выше был сделан вывод о необходимости изучения и проведения ММ в условиях Антарктики для прогнозирования возникновения инфекционных заболеваний и антропогенного влияния на микробиологический состав полярных зон Земли [Панин, 2012].

Основными переносчиками инфекционных заболеваний на Антарктиде являются птицы. На шестом континенте отсутствуют представители семейства мышинных, которые являются частыми переносчиками инфекционных заболеваний на других континентах. Однако на научной станции Молодежная, которая в свое время считалась «столицей полярников» и была по размерам чуть меньше небольшого города, были отмечены следы крыс и тараканов. Однако после закрытия основных научных работ в 1999 г. условия для существования крыс и тараканов пропали, поскольку крысы и тараканы не способны выживать в таких условиях, так как являются синантропными видами. В настоящее время станция используется как полевая база. Во время 50-й экспедиции РАЭ была подтверждена гипотеза о том, что основными источниками и резервуарами

инфекционных заболеваний могут быть пернатые, которые питаются и обитают вблизи научных станций и питаются человеческими отходами [Горбунов, 2006].

В ходе 56-ой РАЭ (2010-2011 гг.) на острове Хасуэлл были обнаружены возбудители иерсиниозов, такие как: *Y. enterocolitica*, *Y. aldovae*, *Y. kristensenii*, а также были выделены условно-патогенные бактерии: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Comamonas terrigena*, *Photothabdus asymbiotica*, *Kingella denitri*. Также в ходе 56-ой экспедиции были обследованы станции «Прогресс», «Новолазаревская», обсерватория «Мирный» и полевая база «Дружная-4». Из окружающей среды всего было выделено 198 штаммов условно-патогенных микроорганизмов. Преобладали бактерии семейств *Pseudomonadaceae* и *Enterobacteriaceae* [Панин с соавт., 2014].

Во время сезонных работ в 2017 г. в результате исследования были обнаружены условно-патогенные бактерии рода *Serratia* (*S. liquefaciens*, *S. marcescens*, *S. ficana*, *S. plymuthica*, *S. liquefaciens* и *S. Grimesii*), *Pseudomonas* (*P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. oryzihabitans*, *P. fluorescens*, *P. luteola*), *Staphylococcus sciuri*, *Citrobacter freundii* [Панин с соавт., 2014].

Довольно часто изолировались следующие виды: *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Eikinella corroides*, *Obesumbacterium proteus*, *Kingella denitrificans*, *Photothabdus asymbiotica*, *Achromobacter xyloso*. Редко можно было встретить представителей следующих видов: *Tatumella plyseos*, *Ochrobacterium anthropic*, *Oligella ureolytica*, *Alcaligenes faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter* (*A. lwoffii*, *A. haemolyticus*), *Klebsiella pneumonia*, *Brevundimonas vesicularis*, *Comamonas terrigena*, *Sutonella indologenes* [Панин и др., 2014]. Обнаруженные микроорганизмы вызывают инфекционные заболевания у лиц со сниженным иммунитетом. Была проведена оценка распределения микроорганизмов и показано, что их количество и разнообразие возрастает к прибрежным зонам, где более мягкий и влажный климат, а также вблизи поселений животных и человека [Панин с соавт., 2017]

Можно заключить, что многие возбудители инфекционных заболеваний приспособились к суровому климату Антарктиды. Последние результаты свидетельствуют, о выявлении трех путей распространения инфекций: с помощью воздушных потоков, благодаря жизнедеятельности антарктических животных и антропогенному изменению среды.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 2.1 Выделение и культивирование штаммов бактерий

Изоляты бактерий выделяли из образцов поверхностного слоя грунта, отобранных на различных участках российских научно-исследовательских станций Прогресс (П), Мирный (М), Оазис Бангера (О.Б) сотрудником кафедры микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург Александром Леонидовичем Паниным 21 марта 2017 г. Всего для анализов было отобрано 39 проб (таблица 1). Пробы хранились и транспортировались при температуре 4°C.

Таблица 1 – Образцы проб грунта с территории российских научно-исследовательских станций на Антарктиде

Станция	Место отбора	Образцы проб
Прогресс	Берег оз. Скандретт.	П 2.3
	База Лоу, под кают-компанией.	П 3.4
	База Лоу, около флагштока.	П 4.2
	База Лоу у последнего сдвоенного домика.	П 5.3
	База Лоу, около входа в станционный туалет.	П 6.5
	Вход в жилой желтый дом для сезонного состава.	П 7.8
	Вход в инсинераторную.	П 8.8
	Ворота в гараж и старую ДЭС.	П 9.3
	Центр метеоплощадки (действующей)	П 11.4
	В 2 м справа от трубы слива из очистной установки.	П 13.9
	В 2 м слева от трубы слива серых вод после очистной установки.	П 14.6
	Под эстакадой склада открытого хранения.	П 15.7; П 15.8
	Место слива хоз. фек. стоков из старой	П 16.3; П 16.4

	медсанчасти.	
	Под старым указателем расстояний от станции.	П 17.4
	Вход в новое здание ДЭС.	П 18.6
	Площадка-стоянка действующего автотранспорта перед ДЭС.	П 19.7
	Вход в основной дом станции.	П 20.7
Оазис Бангера	Вход в кают-компанию.	Оаз.Бан.3.6
	Берег оз. Фигурного в месте забора воды на станцию.	Оаз.Бан 4.6
	Около станционного туалета.	Оаз. Бан 5.6
	Берег озера №3.	Оаз. Бан 6.3
	Старая свалка бочек на станции.	Оаз. Бан 9.4
	Берег солоноватого озера.	Оаз. Бан 11.7
Мирный	Грунт под эстакадой при входе в баню-ДЭС.	М 1.6
	Место для сжигания бытового мусора и ветоши с ДЭС.	М 2.5
	Под эстакадой с ГСМ при входе на ДЭС, со стороны места для сжигания мусора	М 3.4; М 3.5; М 3.5 <sup>1</sup>
	Мыс Мабус, перед входом в гараж	М 4.4; М 4.5
	Место слива банных вод на грунт	М 5.7; М 5.8
	Фоновая проба около метки астропункта.	М 7.4
	Вход в дом геофизиков, под эстакадой при входе.	М 8.5
	Основной вход в кают-компанию на станции.	М 9.9; М 9.10; М 9.11

Из образцов грунта готовили суспензии в стерильном физиологическом растворе и серии разведений, из которых делали посев на поверхность кровяного агара (5% суспензию эритроцитов человека) и среды СБТС. Состав среды СБТС (г/л): питательный агар – 35, желчь очищенная – 6,

глюкоза – 10, мочевины – 5, бромтимоловый синий водорастворимый – 0.128,  $K_2PO_4$  – 1. Выделение чистых культур осуществляли путем повторных истощающих высевов на кровяном агаре. Чистоту культур контролировали микроскопически. Чашки с бактериями культивировали при 37 °С в термостате (“INFORS HT Standart”, Швейцария).

Все микробиологические исследования были проведены в г. Санкт-Петербург в НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, в лаборатории медицинской бактериологии.

## 2.2 Идентификация культур

Идентификация культур проводилась на основании морфологических свойств колоний (размер, форма, цвет и характер пигментации, прозрачность и текстура) и окраски клеток по Граму, с использованием специализированной системы идентификации BioTyper (Bruker Daltonik) и молекулярно-генетических анализов.

### 2.2.1 Метод Масс-Спектрометрии

Для видовой идентификации бактерий с помощью метода масс-спектрометрии (MSP 96 Target, Catalog No. 224989, Bruker Daltonics GmbH, Бремен, Германия) 24-часовую бактериальную культуру (37 °С) переносили на матрицу и высушивали. Затем на высохшую культуру на матрице наносили 1 мкл раствора (10 мг / мл альфа-циано-4-гидрокориновой кислоты (CHCA) (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), 50% ацетонитрил (Sigma-Aldrich, Prague Czech Республика) и 2.5% трифторуксусной кислоты (Sigma-Aldrich, Prague Czech Republic)]. Работа была выполнена на масс-спектрометре MALDI (MSP 96 Target, Catalog No. 224989, Bruker Daltonics GmbH, Бремен, Германия) с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper версии 3.1. Для калибровки использовали стандарт бактериального теста Bruker.

### 2.2.2 Молекулярно-генетическая идентификация бактерий

Микроорганизмы, которые не удалось идентифицировать с помощью рутинных тестов и масс-спектрометрии, идентифицировали с помощью

молекулярно–филогенетического подхода, основанного на гомологии гена 16S рРНК.

### 2.3 Выделение ДНК

Штаммы выращивали на кровяном агаре в течении 48 часов при температуре 37°C. Колонию отбирали со спичечную головку в одноразовые пробирки с раствором РНКазы (400 мкл) и лизоцима (20 мг/мл), инкубировали 30 мин при 37°C. После инкубации добавляли протеазу (10 мкл) и (50 мкл) 10% SDS. Далее раствор инкубировали 60 минут при 60°C. После в раствор добавляли 500 мкл фенола и 300 мкл хлороформа, встряхивали 3 раза. Раствор центрифугировали при 14500 об/мин в течении 5 минут (MiniSpin; Eppendorf). В новый эппендорф отбирали верхнюю фазу и добавляли хлороформ (500 мкл), данный раствор центрифугировали при 14500 об/мин в течении 5 минут. Снова отбирали верхнюю фазу в новый эппендорф и добавляли 100 мкл 10М ацетатаммония ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) и 500 мкл изопропилового спирта ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ ). Раствор центрифугировали при 500 об/мин 5 минут. Осадок клеток дважды промывали 500 мкл  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (70%) и один раз 500 мкл  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$  (96%). Далее этанол сливали. Белый осадок, остающийся на стенках эппендорфа, просушивали в термостате в течении 15 минут при 60°C. После просушки добавляли мQ 50 или 100 мкл в зависимости от видимого осадка. Смесь инкубировали при 60°C 30 минут. Оценку качества и приблизительного количества выделенной ДНК проводили методом электрофореза в агарозном геле.

### 2.4 Реакция амплификации

Изолированная ДНК служила в качестве матрицы для амплификации сайта гена 16S рРНК с использованием праймеров fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'). Использовали специальный набор ScreenMix-HS (Евроген, Россия) для ПЦР. 0.1 мкл каждого праймера в концентрации 20 пкмоль/мкл и 1 мкл ДНК-матрицы вводили в 25 мкл реакционной смеси. Далее смесь помещали в термоциклер MJ MiniResearch



(BioRad) и проводили амплификацию.

### 2.5 Электрофорез в агарозном геле

Анализ продуктов амплификации проводили с использованием электрофореза в агарозном геле. Электрофорез проводили в 1%-ом агарозном геле в TAE буфере (40 мМ трис-ацетат, рН 8; 2 мМ ЕДТА). В качестве красителя использовали бромистый этидий. Продукты ПЦР смешивали с красителем. 5-25 мкл раствора вносили в лунки.

Электрофорез проводили в течение 5 часов при постоянном напряжении 200 В. Результаты электрофореза были визуализированы с использованием прибора GelDoc-It2Imager (UVP, UK).

### 2.6 Секвенирование и анализ 16S рРНК

Секвенирование амплифицированных фрагментов гена 16S рРНК проводилось на базе ресурсного центра Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера с использованием прибора ABI Prism 310 (AppliedBiosystems, USA) в соответствии с протоколом фирмы производителя. Данные секвенирования обрабатывали с помощью программы Chromas.

Полученные в ходе секвенирования, последовательности сравнивали с последовательностями GenBank, используя сервер BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### 2.7 Определение чувствительности к антибиотикам

Определение чувствительности к антибиотикам проводили в соответствии с клиническими и лабораторными стандартами, используя диско-диффузионный метод. Изоляты культивировали в 10 мл бульона Mueller-Hinton (МН) (Merck, Дармштадт, Германия) при 37 °С в течение 24 часов. Ночные культуры, выращенные на бульоне МН (OD, скорректированном до 0.5 единицы MacFarland), равномерно протирали стерильным ватным тампоном на пластинах агара МН и оставляли высыхать в течение 2-4 мин. Затем диски с антибиотиками помещали на поверхность агаризованной среды с помощью дискового диспенсера и инкубировали при

37 °С в течение 24 часов. Использовали диски с азитромицином (15 мкг), пенициллином, амоксиклавом (20/10 мкг), имипенемом (10 мкг), левомицетином (30 мкг), оксациллином (10 мкг), стрептомицином (10 мкг), тетрациклином (30 мкг), фурадонием (300 мкг), цефиксимом (5 мкг), ципрофлоксацином (5 мкг), цефалексине (30 мкг) [Cockerill *et al.*, 2010].

## 2.8 Характеристика адгезивности штаммов *Streptococcus pneumoniae*

Исследовали штаммы *Streptococcus pneumoniae*, выделенные из проб взятых вблизи Антарктических поселений, и клинические штаммы, предоставленные из музейной коллекции Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.

Клетки буккального слизистого эпителия применяли в качестве субстрата. После трех предварительных промывок физиологическим раствором полости рта клетки буккального эпителия собирали у одного и того же донора с внутренней поверхности слизистой оболочки рта с помощью стерильного шпателя в день эксперимента. Клетки взвешивали в 0.15 М физиологическом растворе. Затем три раза промывали от эндогенной микрофлоры путем центрифугирования при скорости 35 g в течение 10 минут. Промытую клеточную суспензию разделяли по 0.5 мл в стерильные пробирки.

24-х часовую культуру стрептококков трижды отмывали 0.15 М в физ. растворе путем центрифугирования при 12500 об/мин в течение 5 минут.

0.5 мл бактериальной культуры смешивали с 0.5 мл суспензии эпителиальных клеток в стерильной пробирке и интенсивно встряхивали. Суспензию инкубировали в термостате 30 минут при температуре 37°С. После инкубации проводили отмывку эпителиальных клеток от не адгезированных микроорганизмов. Готовили мазки и окрашивали их по Граму.

## 2.9 Статобработка

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью стандартного пакета Microsoft Office Excel.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Выделение и характеристика изолятов из различных образцов антарктического грунта и культуральные признаки выделенных штаммов

Изоляты бактерий были выделены из проб, собранных на территории полярных станций Прогресс, Мирный и Оазис Бангера (таблица 1). Данные территории подвергаются значительной антропогенной нагрузке. Показано, что за последние 15 лет, с начала наблюдений, в местах, подвергшихся антропогенному изменению увеличилось количество микроорганизмов в грунте в 3 раза [Convey, 2005].

С целью выявления условно-патогенных и патогенных микроорганизмов разведенные суспензии всех проб высевали на кровяной агар и среду СБТС, которая используется для обнаружения бактерий рода *Yersinia*. Посевы культивировали при 37 °С в течение 24. После культивирования на данных средах изолированные колонии отсеивали секторами на плотные питательные среды до получения чистой культуры. Было получено 39 изолятов.

Далее проводили первичную характеристику изолятов: окраску по Граму, описание морфологии клеток и определение гемолитических способностей (таблица 2). С помощью окраски по Граму обнаружили, что 22 штамма имели грамположительный морфотип, а грамотрицательный морфотип имели 17 штаммов. Больше всего из числа изолятов, обнаруживались бактерии кокковидной формы, их было 22, а 17 изолятов имели палочковидную форму. Все изоляты были исследованы на гемолитическую активность. На кровяном агаре наблюдался гемолиз трех видов: альфа-гемолиз (железо окисляется в гемоглобине, окрашивая кровяной агар в зеленый цвет), бета-гемолиз (красные кровяные тельца полностью лизируются и выглядят как ореол на среде) и гамма-гемолиз (не вызывают внешних изменений).

Таблица 2 – Характеристика морфологии и гемолитической активности  
ИЗОЛЯТОВ

Код пробы	Морфология		Тип гемолиз
	Гр-/Гр+	Форма клеток	а
1) П 2.3	Гр+	Кокки, цепочки	α
2) П 3.4	Гр+	кокки пары	γ
3) П 4.2	Гр+	кокки цепочки	α
	Гр-	палочки	γ
	Гр+	кокки цепочки	α
	Гр+	кокки пары	γ
4) П 7.8	Гр+	кокки тетрады	γ
5) П 11.4	Гр+	кокки	γ
	Гр+	Кокки, цепочки	α
	Гр-	кокки	γ
	Гр+	кокки тетрады	γ
6) П 14.6	Гр+	кокки	β
7) П 15.7	Гр+	кокки тетрады	γ
	Гр-	палочки	γ
	Гр-	палочки	γ
	Гр-	палочки	γ
8) П 16.3	Гр+	кокки	γ
9) П 17.4	Гр+	кокки	γ
10) П 20.7	Гр+	кокки тетрады	γ
11) Оаз.Бан.3.6	Гр-	палочки	γ
12) Оаз. Бан 4.6	Гр+	кокки	β

13)	Оаз. Бан 5.6	Гр-	палочки в парах	γ
		Гр+	палочки	γ
		Гр+	палочки	γ
		Гр-	палочки в парах	γ
14)	Оаз. Бан 6.3	Гр-	палочки одиночные	γ
15)	Оаз. Бан 9.4	Гр+	диплококки	α
		Гр-	палочки одиночные	γ
		Гр-	палочки	γ
		Гр-	диплококки	γ
16)	Оаз. Бан 11.7	Гр+	кокки группами	γ
17)	М 3.5	Гр-	палочки	γ
18)	М 5.8	Гр+	кокки тетрады	γ
		Гр-	палочки	γ
19)	М 8.5	Гр+	кокки цепочки	α
		Гр+	кокки группами	γ
20)	М 9.9	Гр-	одиночные палочки	γ
21)	М 9.10	Гр-	одиночные палочки	γ
22)	М 9.11	Гр-	палочки парами	γ

Если при окраске по Граму обнаруживались грам-отрицательные палочки, то проводили тест на оксидазу, используя тест-полоски (Lachema, Чехия). Бактериальные культуры, дававшие отрицательный тест на оксидазу, идентифицировали с помощью коммерческих тест-систем ENTEROtest 24 N (Lachema, Чехия). При положительном тесте на оксидазу штаммы подвергали идентификации с помощью коммерческой тест-системы NEFERMtest 24 N (Lachema, Чехия). С помощью коммерческого набора ENTEROtest 24 N

(Lachema, Чехия) не удалось идентифицировать ни один штамм, подвергшийся типированию. При использовании NEFERMtest 24 N (Lachema, Чехия) удалось идентифицировать 4 штамма. Результаты представлены в таблице 3, из которой видно, что два изолята из разных проб были идентифицированы как *Pseudomonas putida* с точностью примерно 99-98%, два остальных изолята были идентифицированы как *Eikenella corrodens* и *Pleisiomonas shigelloides*. *P. putida* относят к флуоресцирующим видам, которые также могут вызывать внутрибольничные инфекции у ослабленных лиц [Erol *et al.*, 2014]. Все идентифицированные микроорганизмы способны вызывать оппортунистические заболевания и являются сапрофитными бактериями.

Таким образом, с помощью биохимических тестов нам удалось идентифицировать 4 изолята из 39.

Таблица 3 – Результаты идентификации штаммов по биохимическим свойствам с помощью NEFERMtest 24 N (Lachema, Чехия)

Код пробы / Тест	П 4.2 (1)(2)	П 15. 7 (3)(4)	П 15.7 (1)(2)	П 15. 7 (3)(6)
URE уреаза	+	+	–	–
LAC Лактоза	–	–	–	–
GAL Галактоза	+	+	–	–
ARG Аргинин	+	+	+	+
MAN Маннитол	–	–	–	–
MLT Мальтоза	–	–	–	+

ORN Орнитин	+	+	+	+
TRE Трегалоза	-	-	-	+
CEL Целлобиоза	-	-	-	-
LYS Лизин	-	-	-	+
XYL Ксилоза	-	-	-	-
SUC Сахароза	-	-	-	-
AAM Ацетамид	+	+	-	-
ARA Арабиноза	-	-	-	-
INO Инозитол	-	-	-	+
bGL β - глюкозидаза	-	-	-	-
aGA α - галактозидаза	-	-	-	-
gGT γ - глутамилтрансфераза	+	+	-	+
NAG N-ацетил-β-D- глюкозаминидаза	-	-	-	-
bGA β - галактозидаза	-	-	-	-
PHS Фосфотаза	+	+	-	+

SCI Цитрат Симмонса	–	–	–	–
MAL Малонат	–	–	–	–
ESL Эскулин	–	–	–	–
Идентификация	<i>P. putida</i>	<i>P. putida</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Pleisiomonas shigelloides</i>

### 3.2 Идентификация изолятов с помощью Масс-Спектрометрии

Изоляты бактерий (35 шт), которые не удалось идентифицировать с помощью биохимических тестов, были типированы с помощью MALDI TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation in Time-Of-Flight mass spectrometers). Предыдущие исследования, проведенные для выбора правильной процедуры определения бактерий, показали, что методом прямого мазка были получены очень высокие показатели ( $Score \geq 2.170$ ); таким образом, этот метод экстракции использовали для всех образцов. Идентификация до уровня видов может считаться весьма вероятной при значениях Score 2.150-3.000.

Было идентифицировано до вида 33 штамма (таблица 4). Как видно из рисунка 1, выделенные изоляты относились в трех филум: *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Actinobacteria*. Больше всего было выделено представителей филы *Firmicutes* (45%, 17 изолятов). 39% (15 изолятов) относились к *Proteobacteria*, а 16% (6 изолятов) – *Actinobacteria*.

Из идентифицированных микроорганизмов альфа-гемолиз наблюдался у 6 видов *Streptococcus* (*Streptococcus oralis*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguines*, *Streptococcus parasanguinis*). Бета – гемолиз обнаружился только у двух видов *Staphylococcus epidermidis*. Гамма – гемолиз наблюдался у 26 видов микроорганизмов (рисунок 2).



Таблица 4 – Идентификация изолятов с помощью технологии Maldi-tof

Код пробы	Вид изолята	Score Value
1) П 2.3	<i>Streptococcus oralis</i>	2.345
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2.3
2) П 3.4	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.306
3) П 4.2	<i>Streptococcus salivarius</i>	2.488
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2.404
	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.337
4) П 7.8	<i>Micrococcus luteus</i>	2.279
5) П 11.4	<i>Rotia mucilaginosa</i>	2.45
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2.245
	<i>Psychrobacter sp</i>	2.212
	<i>Micrococcus luteus</i>	2.29
6) П 14.6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.24
7) П 15.7	<i>Micrococcus luteus</i>	2.5
8) П 16.3	<i>Staphylococcus hominis</i>	2.304
9) П 17.4	<i>Staphylococcus succinus</i>	2.208
10) П 20.7	<i>Micrococcus luteus</i>	2.24
11) Оаз.Бан.3.6	<i>Pseudomonas antarctica</i>	2.393
12) Оаз. Бан 4.6	<i>Staphylococcus epidermidi</i>	2.235
13) Оаз. Бан 5.6	<i>Pseudomonas veronii</i>	2.17
	<i>Lactobacillus sp.</i>	2.414
	<i>Carnobacterium maltoromaticum</i>	2.189
	<i>Pseudomonas antarctica</i>	2.286
14) Оаз. Бан 6.3	<i>Eikinella corrodent</i>	2.212
15) Оаз. Бан 9.4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2.19

	<i>Acetobacter sp.</i>	2.2
	<i>Neisseria macacae</i>	2.252
16) Оаз. Бан 11.7	<i>Staphylococcus succinus</i>	2.456
17) М 3.5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2.314
18) М 5.8	<i>Micrococcus luteus</i>	2.318
19) М 8.5	<i>Streptococcus sanguinis</i>	2.5
	<i>Staphylococcus succinus</i>	2.236
20) М 9.9	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	2.408
21) М 9.10	<i>Serratia grimesii</i>	2.337
22) М 9.11	<i>Achromobacter xylosum</i>	2.419

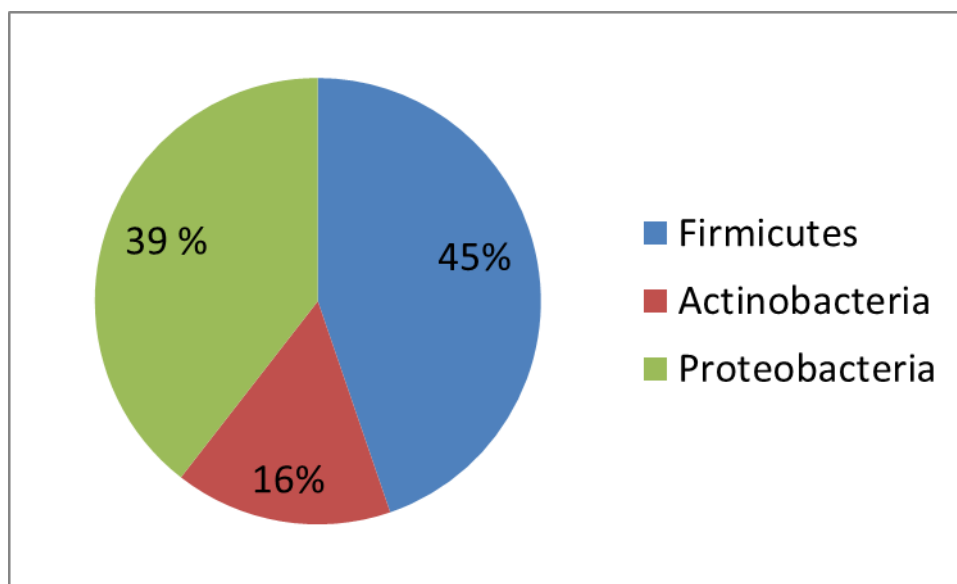


Рисунок 1 – Соотношение бактерий разных фил, выделенных из образцов грунтов на территории Антарктиды.

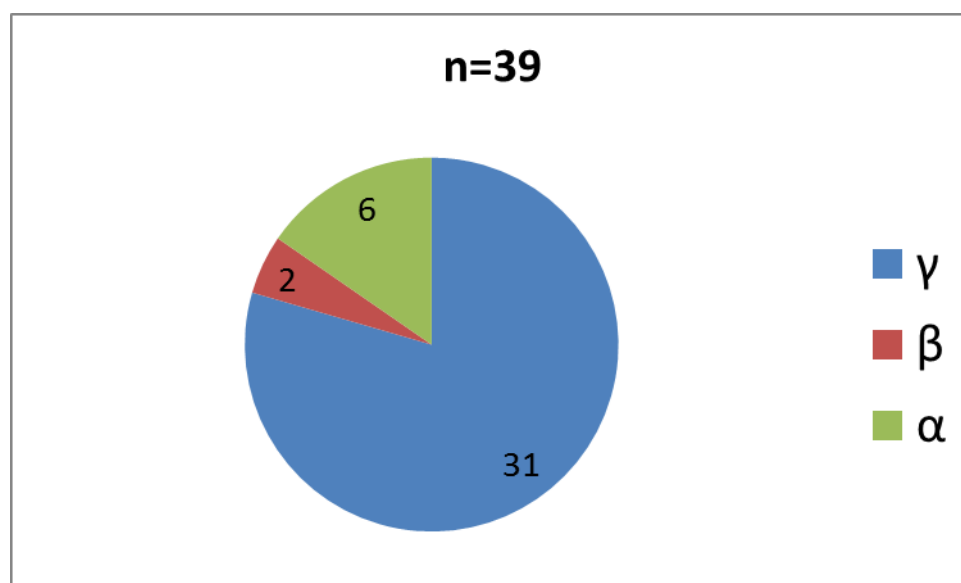


Рисунок 2 – Соотношение типов гемолитической активности у изолятов, выделенных из образцов грунта Антарктиды.

### 3.3 Молекулярно-генетическая идентификация изолятов бактерий, выделенных из грунтов Антарктиды

С целью идентификации микроорганизмов, которые не удалось идентифицировать с помощью коммерческих биохимических тестов и технологии Maldi-tof, была проведена амплификация фрагментов гена 16S рРНК. Амплифицированные фрагменты были очищены и секвенированы.

Секвенированные последовательности анализировали с помощью BLAST-анализа с использованием БД NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Полученные результаты представлены в таблице 5. Для каждого выделенного изолята представлены в таблице наиболее близкие штаммы.

Таблица 5 – Идентификация изолятов по гомологии последовательностей фрагментов гена 16 S рРНК

Номер штамма	Систематическая принадлежность	Степень сходства	Номер последовательности в GenBank
М 5.8	<i>Psychrobacter faecalis</i>	97%	HQ698588.1
О.Б 9.4	<i>Psychrobacter faecalis</i>	98%	HQ698588.1

### 3.4 Определение чувствительности к антибиотикам некоторых изолятов бактерий

Исследовали чувствительность к антибиотикам трех штаммов, выделенных из различных образцов грунта Антарктиды – *Streptococcus pneumoniae* П 2.3, *Staphylococcus epidermidis* П 14.6 и *Rotia mucilaginosa* П 11.4.

Для *S. epidermidis* и *R. mucilaginosa* использовали таблицу интерпретаций для микроорганизмов с обычными питательными потребностями, для штамма *S. pneumoniae* – таблицу интерпретаций для микроорганизмов со сложными питательными потребностями. Результаты по исследованию чувствительности к антибиотикам представлены в таблице 4.

Все выделенные штаммы устойчивы к стрептомицину. Устойчивость к стрептомицину, входящему в класс аминогликозидов, связана скорее всего с мутациями в гене *rpsL* [Bernard *et al.*, 2015]. *S. epidermidis* и *Rotia mucilaginosa* так же устойчивы к амоксиклаву и пенициллину. Данная устойчивость может быть обусловлена продукцией бета-лактамаз 1-го типа. [Yusha *et al.*, 2010]. *S. epidermidis* показал полную устойчивость к азитромицину. Все штаммы были чувствительны к имипенему и оксацаллину.

Больничные штаммы *S. pneumoniae*, *S. epidermidis* и *R. mucilaginosa*, выделенные от больных, оказались устойчивыми к пенициллину и цефалексину. *S. epidermidis* и *R. mucilaginosa* оказались также устойчивыми к тетрациклину, цефиксиму, азитромицину и к имипенему. Штамм бактерии *R. mucilaginosa* оказался устойчивым практически ко всем антибиотикам использованным в эксперименте кроме амоксиклава и ципрофлоксацина, что говорит о мультирезистентности госпитальных изолятов. *Rothia mucilaginosa*, входит в состав микрофлоры ротоглотки и верхних дыхательных путей. В основном вызывает инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом. К амоксиклаву и ципрофлоксацину оказались чувствительными больничные изоляты *S. pneumoniae* и *S. epidermidis*.

Таблица 6 – Чувствительность к антибиотикам микроорганизмов, выделенных из окружающей среды Антарктиды, и больничных штаммов

Антибиотик	Диаметры зон, мм и условное обозначение штаммов					
	Больничные изоляты			Изоляты из Антарктиды		
	<i>S.pneumoniae</i> № 4021	<i>S.epidermidis</i> № 40 42	<i>R.mucilaginosa</i> № 4018	<i>S.pneumoniae</i> П 2.3	<i>S.epidermidis</i> П14.6	<i>R.mucilaginosa</i> П 11.4
Азитромицин 15 мкг	П	У	У	Ч	У	П
Пенициллин	У	У	У	Ч	У	У
Амоксиклав 20/10 мкг	Ч	Ч	Ч	Ч	У	У
Имипенем 10 мкг	Ч	У	У	Ч	Ч	Ч
Левомецетин 30 мкг	Ч	Ч	У	Ч	П	У
Оксациллин 10 мкг	У	У	У	Ч	Ч	Ч
Стрептомицин 10 мкг	П	П	У	У	У	У
Тетрациклин 30 мкг	П	У	У	П	Ч	Ч
Фурадонин 300 мкг	Ч	Ч	У	П	П	Ч
Цефиксим 5 мкг	П	У	У	Ч	П	Ч
Ципрофлоксацин 5 мкг	Ч	Ч	Ч	П	Ч	Ч
Цефалексин 30 мкг	У	У	У	П	П	Ч

Условные обозначения: У – устойчивый; П – промежуточная устойчивость; Ч – чувствительный.

### 3.5 Сравнительный анализ адгезии штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных и из внешней среды

Известно, что одним из ключевых факторов вирулентности патогенных и условно-патогенных бактерий является их способность адгезировать на поверхности различных эпителиальных клеток человека и животных. Провели сравнительную характеристику адгезивных свойств

клинического изолята и изолята, выделенного из объекта внешней среды.

Изучение адгезивных свойств штаммов в отношении буккального эпителия проводилось с помощью светового микроскопа и окраски клеток по Граму. Из объектов окружающей среды (Станция Прогресс, берег озера Скандретт) нами был выделен и идентифицирован штамм *S. pneumoniae* П 2.3 со значением SCORE 2.5-2.6 с помощью масс-спектрометрии, что свидетельствует о высокой вероятности дифференциации до вида. Клинический штамм *S. pneumoniae* № 4021 был предоставлен из музейной коллекции. Штаммы *S. pneumoniae* представлены грамположительными кокками (рисунок 3). Как видно из рисунка 3, штамм *S. pneumoniae* П 2.3 обладает адгезивными свойствами в отношении буккального эпителия: на поверхности эпителиальных клеток видны многочисленные бактериальные клетки, располагающиеся как по одиночно, так и образующих цепочки. Однако адгезивные свойства штамма из окружающей среды ниже, чем у клинического изолята (рисунок 3).

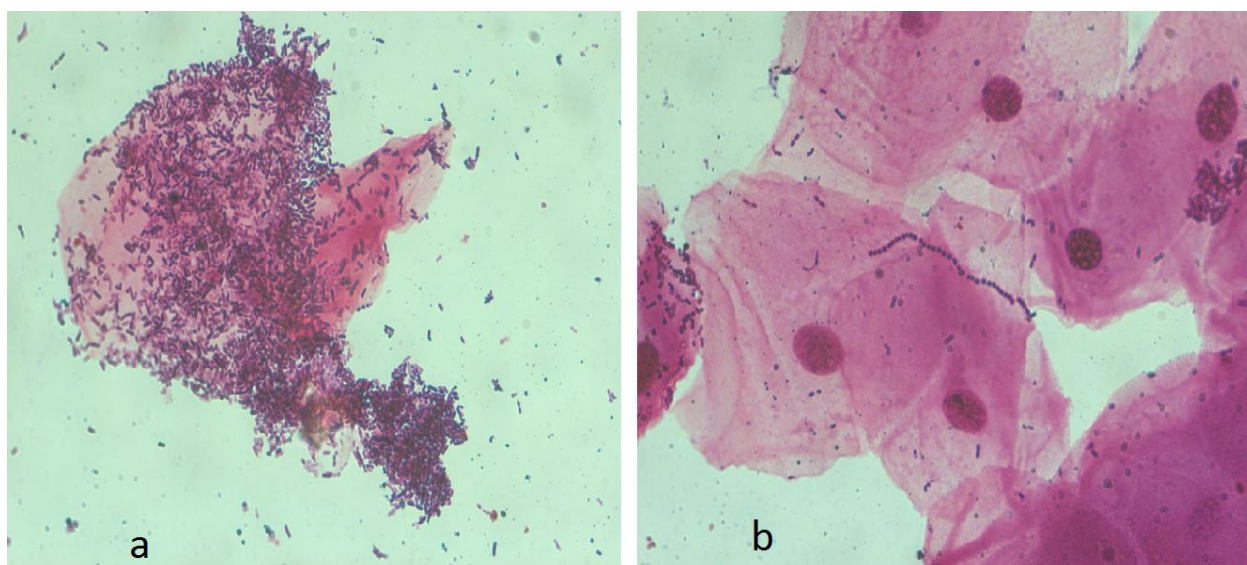


Рисунок 3 – Характеристика адгезивных свойств: (а) клинического штамма *Streptococcus pneumoniae* № 4021 и (б) штамма *Streptococcus pneumoniae* П 2.3, выделенного из почвы на станции Прогресс (Антарктида).

Световая микроскопия, окраска по Граму. Увеличение 100х.

Сравнительная оценка адгезии исследуемых изолятов на более чем 100 клетках буккального эпителия позволила нам определить среднее число бактерий *S. pneumoniae* адгезировавших на одной эпителиальной клетке. Показали, что в случае клинического штамма *S. pneumoniae* среднее число бактерий, адгезировавших на эпителиальной клетке составило 122.4, а штамма *S. pneumoniae*, выделенного из окружающей среды, – 37.9.

Таким образом, установили, что адгезивность клинического штамма в 3.2 раза выше, чем у штамма, полученного с объектов внешней среды. Полученные результаты могут свидетельствовать о большей вирулентности штаммов, выделенных от больных и о потере вирулентных свойств у бактерий, выделенных из неблагоприятных условий.

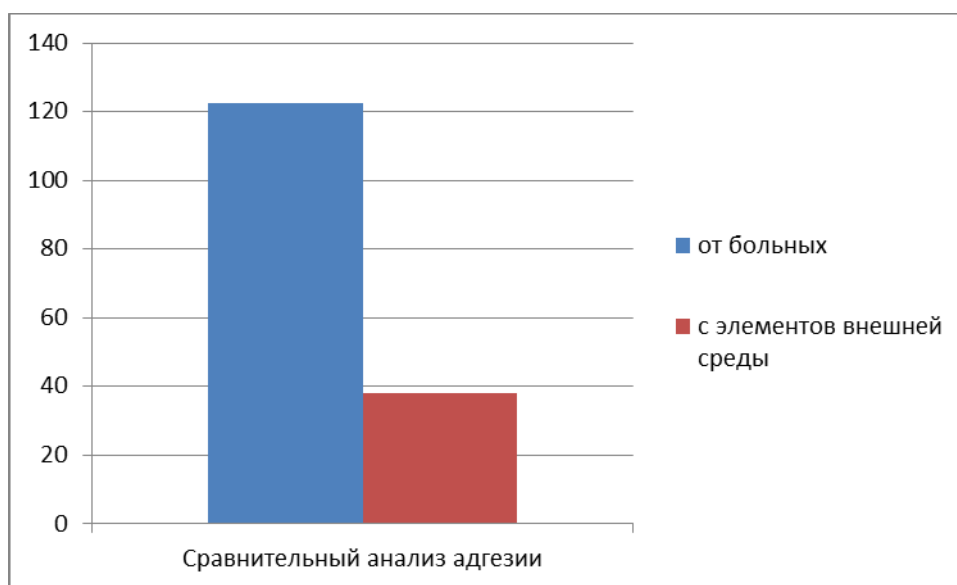


Рисунок 4 - Сравнительный анализ адгезии штаммов *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных и из внешней среды.

## ВЫВОДЫ

- 1) Из различных образцов антарктического грунта выделили 39 изолятов бактерий, 22 из которых имели грамположительный морфотип, а 17 – грамотрицательный морфотип. 22 изолята представлены бактериями кокковидной, а 17 изолятов имели палочковидную форму. При использовании NEFERMtest 24 N удалось идентифицировать 4 изолята: 2 штамма *Pseudomonas putida*, *Eikenella corrodens* и *Pleisiomonas shigelloides*.
- 2) С помощью технологии Maldi-tof удалось идентифицировать 33 изолята. Больше всего было представителей филы *Firmicutes* (45%, 17 изолятов). 39% (15 изолятов) относились к *Proteobacteria*, а 16% (6 изолятов) – *Actinobacteria*. 6 видов *Streptococcus* (*S. oralis*, *S. pneumoniae*, *S. salivarius*, *S. sanguines*, *S. parasanguinis*) вызывали  $\alpha$ -гемолиз на кровяном агаре, два вида *Staphylococcus epidermidis* –  $\beta$ -гемолиз.
- 3) Анализ антибиотикорезистентности 3 штаммов показал, что все изоляты устойчивы к стрептомицину. *Staphylococcus epidermidis* и *Rotia mucilaginosa* так же устойчивы к амоксиклаву и пенициллину. Штамм *S. epidermidis* устойчив к азитромицину. Все штаммы были чувствительны к имипенему и оксацалину. Клинический изолят *R. mucilaginosa* оказался мультирезистентным.
- 4) Сравнительная характеристика адгезивных свойств показала, что штамм *Streptococcus pneumoniae*, выделенный из грунта Антарктиды, обладал способностью адгезировать на поверхности клеток буккального эпителия, хотя его адгезивность была ниже в 3.2 раза в сравнении с клиническим изолятом *S. pneumoniae*.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1) **Абакумов, Е.В.** Почвы Антарктиды [Текст] / Е.В. Абакумов, В.А. Крыленков // СПб Природа. 2011. – С. 58-62.
- 2) **Белов, А.Б.** Эколого-эпидемиологическая систематика инфекционных болезней [Текст] / А.Б. Белов, П.И. Огарков // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – Т.74. - С. 49-53.
- 3) **Белов, А.Б.** Биологическое разнообразие возбудителей инфекционных болезней и эпидемический процесс [Текст] / А.Б. Белов, П.И. Огарков // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. - Т.67. - С. 53-57.
- 4) **Бухарин, О.В.** Механизмы выживания бактерий [Текст] / О.В. Бухарин, А. Л. Гинцбург, Ю. М. Романова, Г. И. Эль-Регистан. // М. – Медицина, 2005. – 367 с. – ISBN 5-870985-089-6.
- 5) **Горбунов, Г.А.** Изучение механизмов взаимного влияния орнитофауны и антропогенного воздействия в районах размещения объектов Российской антарктической экспедиции в условиях прибрежной Антарктиды [Текст] / Г.А. Горбунов, А.Л. Панин, Ш.Б. Тешебаев // Инфекции, обусловленные иерсиниями: материалы II Всероссийской науч.- практ. конф. с междунар. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Л. Пастера, 2006. – С. 63-64.
- 6) **Горбунов, Г. А.** Медицинское обеспечение Российской антарктической экспедиции [Текст] / Г.А. Горбунов, В. Ф. Козак, В. П. Клопов, Ю. И. Сенкевич, В. А. Крыленков. – СПб.: ГУААНИИ, 2009. - Т.65. – С. 55-64.
- 7) **Долгих, А.В.** Разнообразие почвы и почвоподобных тел в оазисе Холмы Тала (Восточная Антарктида) [Текст] / А.В. Долгих, Н. С. Мергелов, А. В. Лупачев, С. В. Горячкин // Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций: материалы I Междунар. науч. - практ. конф. (к. п. Нарочь, 26-29 мая 2014 г.). – Минск: Экоперспектива, 2014. - Т.35. – С. 78-83.

- 8) **Дусмухамедов, Н.С.** Идентификация и биологическая характеристика штаммов психрофильных бактерий, выделенных при диарее полярников и из воды озёр Антарктиды [Текст] / Н.С. Дусмухамедов, Р. Ю. Ташпулатов, В. М. Бондаренко, Н. А. Переверзев // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1978. - Т.67. – С. 55-59.
- 9) **Егоров, И.Я.** Эпидемиологический надзор за особо опасными и природно-очаговыми инфекциями в условиях Крайнего Севера [Текст] / Под ред. И.Я. Егорова, А.С. Марамовича, А.Д. Ботвинкина – Якутск: Кудук, 2000. - Т.74. – 248с.
- 10) **Елкин И.П.** Дизентерия (эпидемиология и профилактика) [Текст] / И.П. Елкин, О.А. Крашенинников. –М.: Медицина, 1975. - Т.14. – С.419-423.
- 11) **Еровиченков А.А.** Диарея путешественников [Текст]/ А.А. Еровиченков // Инфекц. болезни. – 2009. –Т. 7 – С. 54–58.
- 12) **Зуева, Л.П.** Эпидемиология [Текст] / Л.П. Зуева, Яфаев Р.Х. – СПб.: ООО «Издательство ФОЛИАНТ», 2006.– 496 с. – ISBN 978-5-8114-1180-1.
- 13) **Кашнер, Д.** Жизнь микробов в экстремальных условиях [Текст] / Д. Кашнер – М.: Мир - 1982.– Т.47. - С.41-47.
- 14) **Кирцидели, И.Ю.** Разнообразие и ферментативная активность микромицетов из слаборазвитых почв Береговой Антарктики [Текст] / И.Ю. Кирцидели, Д.Ю. Власов, Е.В. Абакумов // Микология и фитопатология. – 2010. - Т. 44. – С. 387-397.
- 15) **Криволицкий, Д. А.** Микроартроподы почв в оперении птиц Антарктики [Текст] / Д. А. Криволицкий, Н.В. Лебедева, М. В. Гаврило // Доклады академии наук. 2004. - Т. 397. – С. 845-848.
- 16) **Киселёва, Б.С.** О выделении бактерий трибы *Klebsielleae* при диарее у полярников [Текст] / Б.С. Киселёва // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии 1978. – Т. 12. – С. 49-52.

- 17) **Литвин, В.Ю.** Эпидемиологические аспекты экологии бактерий [Текст] / В.Ю. Литвин – М.: Фармус-Принт, 1997. - Т. 397. – С. 845-848.
- 18) **Литвин, В.Ю.** Природная очаговость болезней: развитие концепции к исходу века [Текст]/ В.Ю. Литвин, Э.И. Коренберг // Паразитология. - 1999 – Т.84. - С. 179-191.
- 19) **Литвин, В.Ю.** Сапронозы и природная очаговость болезней [Текст]/ В.Ю. Литвин, Г.П. Сомов, В.И. Пушкарева // Актуальные проблемы природной очаговости болезней. Национальные приоритеты России. Омск, 2009 – Т.57. - С.11-12.
- 20) **Лукин, В.В.** Советские и Российские Антарктические экспедиции в цифрах и фактах [Текст] / В.В. Лукин, Н.А. Корнилов, Н.К. Дмитриев // – СПб ГУААНИИ 2006. – Т.68. - 455 с.
- 21) **Львов, Д.К.** Арбовирусы и арбовирусные инфекции / Д.К. Львов, С.М. Клименко, С.Я. Гайдамович [Текст] // – М. Медицина, 1989. - Т.74. - С.419-423.
- 22) **Матусов, А.Л.** Условия жизни и состояние здоровья участников полярных экспедиций [Текст] / А.Л. Матусов – Л.: Гидрометеиздат, 1979- Т.78. - С.49-53.
- 23) **Одум, Ю.** Экология [Текст] / Ю. Одум – М.: Мир, 1986. - Т. 1. – С.328-376 с.
- 24) **Павловский, Е.Н.** Учение о природной очаговости трансмиссивных болезней [Текст] / Е.Н. Павловский // Журн. общей биологии, 1946. – Т. 7. – С.38-47.
- 25) **Панин, А.Л.** Контроль санитарного состояния станций Российской антарктической экспедиции [Текст] / А.Л. Панин // Материалы 50 Сезонной Российской антарктической экспедиции. Т. 2, ч. III. - Работа научных отрядов и групп (отв. Мартьянов В.Л.). - СПб.: ГУААНИИ, 2005. - Т.4. – С. 427-462.
- 26) **Панин, А.Л.** Изучение механизмов взаимного влияния орнитофауны и антропогенного воздействия в районах размещения объектов Российской антарктической экспедиции (Факультативная программа)

- [Текст] / А.Л. Панин // Материалы 50 Сезонной Российской антарктической экспедиции. Т. 2, ч. III. - Работа научных отрядов и групп (отв. Мартьянов В.Л.). - СПб.: ГУААНИИ, 2005. - Т.8. – С. 463-487.
- 27) **Панин, А.Л.** Организация микробиологического мониторинга в системе санитарно-эпидемиологического надзора за психрофильными микроорганизмами в районах расположения Российской антарктической экспедиции [Текст] / А.Л. Панин // Военно-морская и радиационная гигиена: традиции, инновации, перспективы: материалы Юбил. науч. - практ. конф., посвященной 70-летию кафедры ВМРГ ВМедА им. С.М. Кирова. – СПб. 2010. - Т.48. – С. 166-169.
- 28) **Панин, А.Л.** Микробиологический мониторинг на антарктических станциях России: ретроспективный взгляд в будущее [Текст] / А.Л. Панин, А. Б. Белов, Л. А. Краева, В. Н. Болехан, Н. Г. Владимирова, А. Е. Гончаров, Д. Ю. Власов, Ш. Б. Тешебаев, А. Н. Шаров, А. В. Толстикова // Профилактическая и клиническая медицина. – 2012. . - Т.78. – С.70-75.
- 29) **Панин, А.Л.** Микробиологический мониторинг иерсиний как основа санитарно-эпидемиологического надзора за иерсиниозами в организованных коллективах [Текст] / А.Л. Панин, А. Б. Белов, Н. Г. Владимирова, А. Е. Гончаров, Д. Ю. Власов, Ш. Б. Тешебаев, А. Н. Шаров, А. В. Толстикова // Инфекция и иммунитет. – 2013. - Т.48. – С. 217-228.
- 30) **Панин, А.Л.** Цианобактериальные маты как объекты мониторинга антарктических экосистем [Текст] / А.Л. Панин, А. Б. Белов, В. Н. Болехан, А. Е. Гончаров, Д. Ю. Власов, Ш. Б. Тешебаев, А. Н. Шаров, А. В. Толстикова // Вестн. СПбГУ. – 2013- Т.5. - С. 3-11.
- 31) **Панин, А.Л.** Роль микробиологического мониторинга территории прибрежной Антарктиды в изучении глобального изменения климата Земли [Текст] / А.Л. Панин, А. Б. Белов, Л. А. Краева, Д. Ю. Власов, Ш.

- Б. Тешебаев, А. Н. Шаров, А. В. Толстиков // Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций: материалы I Междунар. науч. - практ. конф. (к. п. Нарочь, 26-29 мая 2014 г.). – Минск: Экоперспектива, 2014. – С. 209-215.
- 32) **Покровский В.И.** Бактериальная дизентерия [Текст] / В.И. Покровский, Н.Д. Ющук. – М.: Медицина, 1994. – Т.65. - 256 с.
- 33) **Покровский В.И.** Глобализация и эпидемический процесс [Текст] / В.И. Покровский, Н.И. Брико // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2010. – Т 4. – С. 4–10.
- 34) **Самышев, Э.З.** Биологические и токсикологические предикторы потепления климата в Антарктике [Текст] / Э.З. Самышев // Мониторинг состояния природной среды Антарктики и обеспечение деятельности национальных экспедиций: материалы I Междунар. науч. - практ. конф. (к. п. Нарочь, 26 – 29 мая 2014 г.). – Минск: Экоперспектива, 2014. – С. 224-231.
- 35) **Сбойчаков, В.Б.,** Природноочаговые инфекции шестого континента: ретроспективный взгляд в будущее [Текст] / В.Б. Сбойчаков, А.Л. Панин, А.Б. Белов // Журн. Национальные приоритеты России, 2014. – Т13 – С. 29-33.
- 36) **Сомов, Г.П.** Психрофильность патогенных бактерий [Текст] / Г.П. Сомов, Т.Н. Варвашевич, Н.Ф. Тимченко. - Новосибирск: Наука, 1991. – Т.28. – 204 с.
- 37) **Сомова, Л.М.** Ультраструктура патогенных бактерий в разных экологических условиях [Текст] / Л.М. Сомова, Л.С. Бузолева, Н.Г. Плехова; под ред. Н.Н. Беседновой. – Владивосток: Медицина ДВ, 2009. – Т.65. – 200 с.
- 38) **Софронова, О.Н.,** Изоляция культур возбудителя псевдотуберкулёза и кишечного иерсиниоза из органов серых крыс в г. Якутске [Текст] / О.Н. Софронова // Вопросы региональной гигиены, санитарии,

- эпидемиологии и медицинской экологии: материалы науч.-практ. конферен. , Якутск, 24-25 сентября 2009 г.. – С. 313-316.
- 39) **Степанова, Р.И.**, О роли водного фактора в проблеме острых кишечных инфекций [Текст] / Р.И. Степанова // Вопросы региональной гигиены, санитарии, эпидемиологии и медицинской экологии: материалы научно-практической конференции , Якутск, 24-25 сентября 2009 г.). – С. 243-245.
- 40) **Ташпулатов, Р. Ю.** Изучение морфологических и биологических свойств облигатных и факультативных психрофильных бактерий, выделенных в условиях Антарктиды [Текст] / Р.Ю. Ташпулатов, Бондаренко В.М., Дусмухамедов Н.С. // Антарктика. – М.: Наука, 1981. – Т.20. – С. 169-182.
- 41) **Терских, В.И.** Сапронозы (о болезнях людей и животных, вызываемых микробами, способными размножаться вне организма во внешней среде, являющейся для них местом обитания) [Текст] / В.И. Терских // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1958. - Т 8. – С. 118-122.
- 42) **Тешебаев, Ш.Б.** Использование ПЦР для выявления иерсиний в районе размещения объекта Российской антарктической экспедиции [Текст] / Ш.Б. Тешебаев, А.Е. Гончаров, Д. Ю. Власов, Ш. Б. Тешебаев, А. Н. Шаров, А. В. Толстикова // Генодиагностика инфекционных болезней: материалы VI Всероссийской науч. - практ. конф. с междунар. участием. Т. II. - М., 2007.– С. 163-164.
- 43) **Тешебаев, Ш.Б.** Работы сезонной экологической группы (отряда) в 56 Российской антарктической экспедиции по исследованию химических и санитарно-бактериологических характеристик антропогенного воздействия на окружающую среду в районах прибрежной Антарктиды [Текст] / Ш.Б. Тешебаев, А.Л. Панин, Е.Д. Добротина // Материалы 56 Сезонной РАЭ. Т. 2, ч. III. - Работа научных отрядов и групп (отв. Кучин В.И.). – СПб.: ГУААНИИ, 2011. – С. 63-87.

- 44) **Belzile C.** Bio-optical characteristics of the snow, ice and water column of a perennially ice-covered lake in the high Arctic [Text] / Vincent W.F., Gibson J.A.E. // *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* - 2001. - V.58. - P.2405-2418.
- 45) **Bowman J.P.** Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hills, Eastern Antarctica [Text] / Rea S.M., McCammon S.A. // *Environ. Microbiol.* - 2000. - V.2. - P.227-237.
- 46) **Bonnedahl, J.** In Search of Human-associated Bacterial Pathogens in Antarctic Wildlife: Report from Six Penguin Colonies Regularly Visited by Tourists [Text] / J. Bonnedahl // *AMBIO: A Journal of the Human Environment.* - 2005. – Vol. 34. P. 430-432.
- 47) **Brambilla E.**, 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica [Text] / Hippe H., Hagelstein A // *Extremophiles* - 2001. - V.5 - P.23-33.
- 48) **Christner B.C.**, Molecular identification of Bacteria and Eukaryotes inhabiting an Antarctic cryoconite hole [Text] / Kvitko B.H. II, Reeve J.N. // *Extremophiles.* - 2003. - V.7. - P.177-183.
- 49) **De la Torre J.R.**, Microbial diversity of crypto endolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica [Text] / Goebel B.M., Friedmann E.I. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2003.- V.69. - P.3858-3867
- 50) **Giichiro, O.** Meeting on Antarctic medical research in 2004 [Text] / O. Giichiro, W. Kentaro // *Antarctic Record.* - 2005. - V. 49. - P. 128-132.
- 51) **Poma, H. R.** Towards a rational strategy for monitoring of microbiological quality of ambient waters [Text] / H.R. Poma, D. Gutiérrez Cacciabue, B. Garcé, E. Gonzo, V. Rajal // *Sci. Total Environ.* – 2012. – N 433. – P. 98-109.
- 52) **Tison, D.L.** Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (cyano-bacteria) [Text] / D.L. Tison, D.H. Pope, W.B. Cherry // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1980. – V. 39, N 2. – P. 456-459.
- 53) **Tison, D.L.** *Legionella* in aquatic habitats in the Mount Saint Helens blast

zone [Text] / D.L. Tison, J.A. Baross, R.J. Seidler // Curr. Microbiol. –  
1983. – V. 9, N 6. – P. 345-348.