

Подходы к определению *Pseudomonas aeruginosa* в воде в национальной и международной нормативно-методической базе

С. Н. Тымчук, к. м. н.^{1, 2}, Е. Ю. Спиридонова¹, Л. В. Бугаевская¹

УДК 543.3

Рассмотрены методики, применяемые для обнаружения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) в различных водах. Проведено сравнение основных характеристик методик, приведены их недостатки и преимущества. Обращено внимание на противоречивые требования, установленные в разных методиках, низкую чувствительность методик, не предусматривающих концентрирование пробы, и необходимость применения устаревших процедур анализа, а также питательных сред с низкими ростовыми и дифференцирующими свойствами. На примере методик определения *P. aeruginosa* в воде показано, что отечественная методическая база по санитарному контролю качества вод, в том числе на соответствие требованиям к упакованной воде (ТР ЕАЭС 044 / 2017), нуждается в модернизации с учетом международного опыта в данной области.

Ключевые слова: санитарные показатели качества воды, синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), методики контроля качества вод, свойства питательных сред для микробиологических исследований

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) считается основным возбудителем инфекционных заболеваний, вызываемых псевдомонадами. *P. aeruginosa* – сапрофит и широко распространена в окружающей среде, поэтому она не может рассматриваться как показатель фекального загрязнения, как предполагалось изначально. Однако из-за крайне низких питательных потребностей и способности развиваться на самых бедных питательных субстратах *P. aeruginosa* является важным

санитарным показателем, характеризующим общее состояние различных водных объектов. Ее обнаружение в воде свидетельствует не только об эпидемиологическом неблагополучии (наличии потенциального возбудителя инфекционных заболеваний в исследуемом объекте), но и о технологических проблемах водоподготовки.

В отечественной практике обязательному исследованию на наличие *P. aeruginosa* подлежат воды плавательных бассейнов и аквапарков [1]. Этот же документ регламентирует определение синегнойной палочки в питьевой воде централизованного водоснабжения, как дополнительный показатель при обнаружении роста оксидазоположительных бактерий. Определение *P. aeruginosa* в питьевых

¹ ЗАО «РОСА», Москва, Россия.

² mail@rossalab.ru.

Таблица 1. Сравнение требований нормирующих документов к содержанию *P. aeruginosa* в различных водных объектах

Исследуемый объект	Нормирующий документ	Норматив	Нормируемый объем
Вода бассейнов и аквапарков	СанПиН 1.2.3685-21	Отсутствие	1 дм ³
Питьевая вода централизованного водоснабжения		Отсутствие	500 см ³
Упакованная питьевая вода (в т. ч. минеральная)	СанПиН 2.1.4.1116-02	Отсутствие	1 дм ³
	СанПиН 2.3.2.1078-01	Отсутствие	100 см ³
	ТР ЕАЭС 044/2017	Отсутствие	250 см ³

бутилированных водах регламентирует [2]. Кроме того, контроль данного показателя в минеральной воде и напитках предполагает и другой документ [3]. Одновременно с отечественными нормативными актами действует технический регламент Евразийского экономического союза ТР ЕАЭС 044 [4], который предусматривает количественное определение *P. aeruginosa* во всех типах упакованных вод, предназначенных для рынка ЕАЭС.

Требования указанных документов значительно отличаются нормируемыми объемами, в которых не допускается наличие синегнойной палочки (табл. 1). Особенно это значимо при нормировании качества упакованной воды.

К сожалению, несогласованность требований одновременно действующих нормативных документов, регламентирующих безопасность водных

объектов, является отражением общего состояния отечественного санитарного нормирования.

Что же касается методического обеспечения, то тут имеются еще более серьезные противоречия между отечественной и международной нормативной базой (табл. 2).

Все методики для исследования воды на соответствие отечественным нормативным документам, представленные в таблице, являются производными от методических рекомендаций 1984 года «Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях)» [5].

Таким образом, все действующие отечественные нормативные документы [1-3] предлагают использовать методику 80-х годов прошлого века, которая существенно устарела.

Прежде всего, в методике не предусмотрено концентрирование пробы. Отсутствие данного этапа приводит к снижению чувствительности методики при низких уровнях исходной контаминации, а также к необходимости инкубировать посеы больших объемов (2 объема по 0,5 л на каждую пробу), в результате чего полезный объем термостатов используется нерационально. В качестве среды обогащения используется среда Бонде, обладающая низкими ростовыми свойствами, даже для псевдомонад, и содержащая ингибитор роста – кристаллический фиолетовый, что не оправдано при исследовании объектов с низкими уровнями

Таблица 2. Методическое обеспечение требований нормирующих документов по определению *P. aeruginosa* в различных водных объектах

Исследуемый объект	Нормирующий документ	Методический документ	Метод
Вода бассейнов и аквапарков	СанПиН 1.2.3685-21	ГОСТ 34786-21	Качественный
Питьевая вода централизованного водоснабжения			
Упакованная вода минеральная (в т. ч. минеральная)	СанПиН 2.1.4.1116-02	МУ 2.1.4.1184-03	Качественный
	СанПиН 2.3.2.1078-01	МР 1984 года	Качественный
	ТР ЕАЭС 044 / 2017	ГОСТ ISO 16266-2018 или ГОСТ Р 54755-2011	Количественный

контаминации. Высев обогащенного материала проводится на среду Блеск, дифференцирующие свойства которой на данный момент вызывают определенные сомнения. Среда Блеск – это молочный агар с ТТХ (трифенилтетразолий хлорид), и его восстановление до трифенилформаза придает колониям бордовый цвет, а в ряде случаев и золотистый блеск.

Однако, видоспецифичность среды Блеск в отношении *P. aeruginosa* достаточно спорна, так как восстановление ТТХ является признаком активности бактериальных ферментов дегидрогеназ, которые присущи всем бактериям, а не только *P. aeruginosa*, а появление блеска лишь отражает высокую активность ферментативного окисления. Кроме того, появление блеска зависит от целого ряда параметров, и, в частности, от состава среды, что признают и сами разработчики. Среда Блеск является нестандартизованной средой, которая готовится *ex tempore*, и ее эффективность в значительной степени зависит от состава компонентов, прежде всего питательной агаровой основы, а также молока, используемого для ее приготовления. Как признают авторы методики [5], приемлемые результаты получаются только при использовании в качестве агаровой основы мясо-пептонного агара, который в настоящее время не готовят ни в одной лаборатории. Использование в качестве основы готового коммерческого питательного агара в «ускоренном» варианте среды значительно ухудшает проявление признака – от сплошного блеска до «блестящих точек на поверхности колоний или блестящего ободка вокруг колонии».

Проведенные в ЗАО «РОСА» эксперименты по параллельному исследованию двумя методами проб нативной воды, контаминированной монокультурами тестовых штаммов эталонных культур, а также их смесями [6], продемонстрировали следующее:

- методика из МР 1984 года [5] не позволяет определять наличие *P. aeruginosa* в количестве порядка десятков клеток в литре, в то время как именно эти уровни загрязнения актуальны для подготовленной воды;
- низкая чувствительность метода обусловлена, на наш взгляд, отсутствием этапа концентрирования пробы и низкими ростовыми свойствами среды Бонде;
- при низких уровнях контаминации, которые метод уже способен определить (порядка сотен КОЕ/л), среда Бонде не мутнеет и на ее поверхности не образуется пленка, поэтому отсутствие этих признаков не может быть поводом для выдачи отрицательного результата;

- среда Блеск, по результатам наших исследований [7], не обладает исключительной видоспецифичностью в отношении *P. aeruginosa*, а значит, наличие или отсутствие золотистого блеска на данной среде не может рассматриваться как единственный признак, подтверждающий принадлежность выделенной культуры к данному виду. Появление блеска зависит от состава агаровой основы, молока, срока инкубации, количества и соотношения целевых микроорганизмов и посторонней флоры и является отражением ферментативной активности микроорганизмов, а не их видовой принадлежности.

Другими словами, методика из МР 1984 года давно требует модернизации. Однако, изменения, которые были внесены в эту методику в 2003 году в МУ 2.1.4.1184-03 [8] и затем в 2021 году в ГОСТ 34786-21 [9], привели к ее существенному ухудшению и к снижению предела обнаружения.

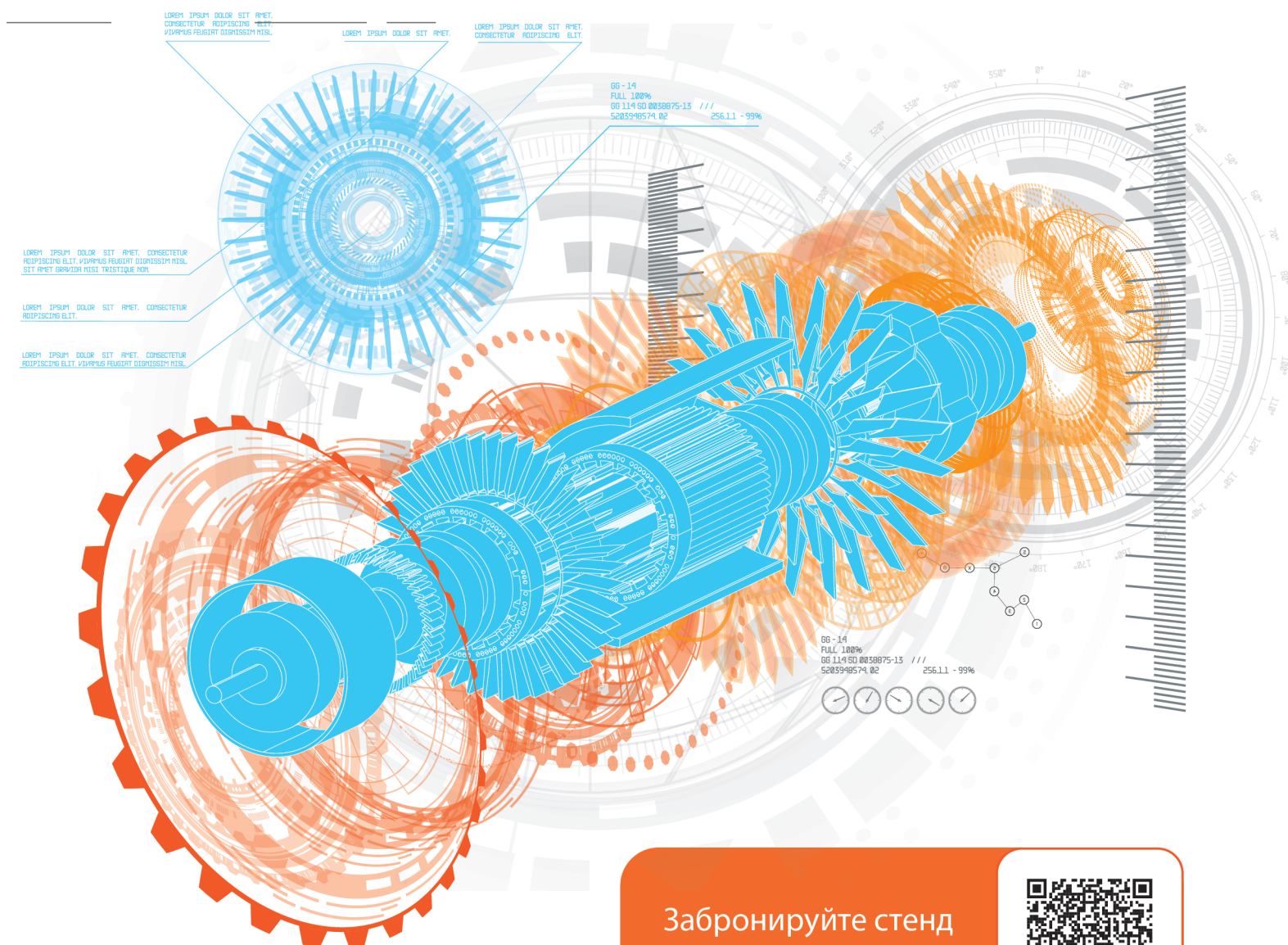
В новых вариантах методик отмечены следующие недостатки:

- исчезла идентификация беспигментных штаммов. Согласно МУ 2.1.4.1184-03 при отсутствии пигмента пиоцианина у выделенных клонов выдается отрицательный результат, хотя по данным литературы, 10% штаммов *P. aeruginosa* не образуют пигментов феназинового ряда [10, 11]. В ГОСТ 34786-21 [9] пигмент пиоцианин вообще не упоминается как факт, в то время как образование сине-зеленого пигмента пиоцианина – это ключевой признак при определении синегнойной палочки;
- наличие пигментов по МУ 2.1.4.1184-03 определяют не на специализированной среде Кинга А (среда № 9), как в исходной методике, а на обычном питательном агаре, что недопустимо. По ГОСТ 34786-21 пигмент не определяют вообще;
- по МУ 2.1.4.1184-03 пигментообразование подтверждается только у колоний с золотистым блеском, но при наличии типичного роста в среде Бонде это исследование можно не проводить, а сразу выдавать положительный результат, только по наличию блеска! Хотя мы показали, насколько нестабилен признак блеска и от скольких параметров он зависит [6];
- при отсутствии колоний с блеском выдается отрицательный результат, тогда как в исходной методике [5] на способность образовывать пиоцианин блестящие колонии исследовались в обязательном порядке, а в их отсутствии исследовались колонии без блеска;

Testing & Control 20 Year

24–26 октября 2023
Москва, Крокус Экспо

20-я юбилейная Международная
выставка испытательного
и контрольно-измерительного
оборудования



Забронируйте стенд
testing-control.ru



Организатор



Международная
Выставочная
Компания

+7 (495) 252 11 07
control@mvk.ru

- и наконец, при отсутствии видимого помутнения в среде Бонде отрицательный результат выдается без выполнения посева на плотные среды!

Таким образом, выполняя модификацию методики по МУ 2.1.4.1184-03 строго и формально, мы будем получать заведомо существенно заниженные результаты и не сможем определять *P.aeruginosa* даже в концентрациях 100–1000 КОЕ/л.

К положительным моментам ГОСТ 34786-21 в части определения *P.aeruginosa* можно отнести два: во-первых, методика в качестве альтернативной среды разрешает использовать цетримидный агар, а, во-вторых, разрешает определять *P.aeruginosa* по ГОСТ ISO 16266-2018, который является аутентичным переводом ISO 16266 : 2006.

Межнациональный стандарт [12] и национальный стандарт [13] включены в перечень документов, используемых для подтверждения соответствия упакованной воды техническому регламенту ТР ЕАЭС 044. Обе методики являются количественными, рекомендуют использовать мембранную фильтрацию, а в качестве селективной среды для первичного посева – цетримидный агар. Каждая из них имеет свои плюсы и минусы.

Принципиальным недостатком ГОСТ Р 54755-2011 является то, что согласно области применения документ распространяется на пищевые продукты и ориентирован на концентрации не менее 150 КОЕ/мл жидкого продукта, что для упакованной воды неприемлемо. Однако документ содержит раздел (п. 9.3), разрешающий использование мембранной фильтрации, что в принципе позволяет исследовать и воду.

К преимуществам методики можно отнести простой и четкий алгоритм идентификации, в том числе и беспигментных штаммов, на основании четырех простых и безопасных тестов (определение грампринадлежности, цитохромоксидаза, редукция нитратов и утилизация мальтозы).

Главным недостатком методики ГОСТ ISO 16266-2018, в отличие от ГОСТ Р 54755-2011, является сложный, громоздкий аппарат идентификации, основанный на использовании ацетамидного бульона для определения образования аммиака из ацетамида. Ацетамид – канцероген и его использование в лаборатории сопряжено с высоким риском для здоровья сотрудников и загрязнения окружающей среды, хотя образование аммиака – это далеко не самый надежный тест при идентификации синегной палочки. Нестабильность пигментообразования на цетримидном агаре разных партий увеличивает количество постановок тестов с ацетамидом.

Этот недостаток можно отчасти скомпенсировать введением дополнительного этапа по определению пигмента пиоцианина на специальных средах, например, на отечественной среде № 9.

Если подвести общий итог, то на примере показателя *P.aeruginosa* можно сказать, что отечественная нормативно-методическая база в области санитарного нормирования безопасности воды далека от идеала и содержит массу противоречий.

Настораживает существующая в последнее время практика разработки национальных стандартов по биологическим исследованиям на основе старых методических документов 70–80-х годов без учета современных достижений микробиологической науки. В результате получаются документы, содержащие неадекватные требования. Данное заключение подтверждают четыре проекта национальных стандартов на методы бактериологических, вирусологических и паразитологических исследований воды, находящихся на рассмотрении экспертного сообщества, тексты которых содержат много ошибок и нуждаются в серьезной переработке.

Что же касается определения *P.aeruginosa*, то очень хочется надеяться, что Российская Федерация присоединится к странам ЕАЭС, использующим методику ГОСТ ISO 16266-2018, и микробиологические лаборатории получат современный инструмент для работы.

Литература

1. СанПиН 1.2.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2021 года № 2.
2. СанПиН 2.1.4.1116-02. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в емкости. Контроль качества. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 19 марта 2002 года № 12.
3. СанПиН 2.3.2.1078-01. Продовольственное сырье и пищевые продукты. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 14 ноября 2001 года № 36.
4. ТР ЕАЭС 044/2017. О безопасности упакованной питьевой воды, включая природную минеральную воду.
5. Методические рекомендации. Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях), 1984. 17 с.
6. Тымчук С. Н., Ахапкина Е. Н., Ларин В. Е., Буданова Е. В., Нечаев Д. Н. Не все то золото, что блестит. *Контроль качества продукции*, 2017;10:18–24.
7. Тымчук С. Н., Ахапкина Е. Н., Ларин В. Е., Буданова Е. В., Нечаев Д. Н. Шаг вперед, два шага назад. Эффективность методик определения *Pseudomonas aeruginosa* в воде. *Контроль качества продукции*, 2017;11:49–56.
8. МУ 2.1.4.1184-03. Методические указания по внедрению и применению санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.4.1116-02. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. 68 с.

- ГОСТ 34786-21. Вода питьевая. Методы определения общего числа микроорганизмов, колиформных бактерий, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и энтерококков. М.: Российский институт стандартизации, 2021. 32 с.
- ISO 16266 : 2006. Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration, 11 p.
- ISO 8360-1 : 1988. Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Part 1: Method by enrichment in liquid medium. 1988. 10 p.
- ГОСТ ISO 16266-2018. Качество воды. Обнаружение и подсчет *Pseudomonas aeruginosa*. Метод мембранной фильтрации. Минск: Госстандарт, 2018. 11 с.
- ГОСТ Р 54755-2011. Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*. М.: Стандартинформ, 2012. 16 с.
- Guidelines. Detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in environmental objects (food, water, waste liquids), 1984. 17 p.
- Tymchuk S. N., Ahapkina E. N., Larin V. E., Budanova E. V., Nechaev D. N. All that glitters is not gold. *Kontrol' kachestva produkcii – Product quality control*, 2017; 10:18-24.
- Tymchuk S. N., Ahapkina E. N., Larin V. E., Budanova E. V., Nechaev D. N. One step forward, two steps back. The effectiveness of methods for the determination of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Kontrol' kachestva produkcii – Product quality control*, 2017;11:49-56.
- MU 2.1.4.1184-03. Guidelines for the implementation and application of sanitary and epidemiological rules and regulations SanPiN 2.1.4.1116-02. Moscow. *Federal'nyj Centr Gossanepidnadzora Minzdrava Rossii Publ.*, 2003. 68 p.
- GOST 34786-21. Drinking water. Methods for determining the total number of microorganisms, coliform bacteria, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus*. Moscow. *Rossijskij Institut Standartizacii Publ.*, 2021. 32 p.
- ISO 16266 : 2006. Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration, 11 p.
- ISO 8360-1 : 1988. Water quality – Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Part 1: Method by enrichment in liquid medium. 1988. 10 p.
- GOST ISO 16266-2018. Water quality. Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*. Method by membrane filtration. *Minsk. Gosstandart Publ.*, 2018. 11 p.
- GOST R 54755-2011. Food products. Methods for detection and quantity determination of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria. Moscow. *Standartinform Publ.*, 2012. 16 p.

References

- SanPiN 1.2.3685-21. Hygienic standards and requirements for ensuring the safety and (or) harmlessness of environmental factors for humans. *Postanovlenie Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF*. 28.01.2021. No. 2.
- SanPiN 2.1.4.1116-02. Drinking water. Hygienic requirements for the quality of water packaged in a container. *Quality control. Postanovlenie Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF*. 19.03.2002. No. 12.
- SanPiN 2.3.2.1078-01. Food raw materials and food products. Hygienic requirements for the safety and nutritional value of food products. *Postanovlenie Glavnogo gosudarstvennogo sanitarnogo vracha RF*. 14.11.2001. No. 36.
- ТР ЕАЭС 044/2017. On the safety of packaged drinking water, including natural mineral water.

Статья поступила в редакцию 17.07.2023
Принята к публикации 18.08.2023

08.06.1936 – 10.07.2023

Игорь Александрович Ревельский

С глубоким прискорбием сообщаем, что ушел из жизни ведущий научный сотрудник кафедры аналитической химии химического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова доктор химических наук, профессор Игорь Александрович Ревельский.

Игорь Александрович – выдающийся ученый, который внес большой вклад в развитие газовой, ионной хроматографии, хромато-масс-спектрометрии и других методов аналитической химии.

Он разработал метод масс-спектрометрии с фотоионизацией при атмосферном давлении; предложил новые подходы к селективному концентрированию и определению ряда органических токсикантов для анализа вод, продуктов

питания; разработал новый подход к контролю качества оригинальных лекарственных препаратов и их дженериков и способ сопоставления их физиологической активности.

Игорь Александрович всегда сочетал решения практических задач химического анализа с одновременным развитием общих методов аналитической химии.

Игорь Александрович – заслуженный химик Российской Федерации, лауреат золотой медали Всероссийского масс-спектрометрического общества.

Не стало замечательного ученого, нашего доброго друга и коллеги. Светлая память об Игоре Александровиче сохранится в сердцах всех его коллег и учеников.

