

## ХАРАКТЕРИСТИКА СПОСОБНОСТИ К ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЁНОК МИКРООРГАНИЗМАМИ, ВХОДЯЩИМИ В СОСТАВ БИОЦЕНОЗОВ ПЛАВАТЕЛЬНЫХ БАСЕЙНОВ

Пугач В. В., Горбунов В. А.

Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и  
микробиологии, Минск, Беларусь

*Введение.* Способность к формированию биоплёнок представителями микробиоценозов плавательных бассейнов – параметр, значимый для оценки рисков для здоровья их посетителей.

*Цель исследования* – охарактеризовать способность к формированию биоплёнок микроорганизмами, входящими в состав биоценозов плавательных бассейнов.

*Материал и методы.* Способность 187 штаммов микроорганизмов к формированию биоплёнок исследована с помощью стандартной методики.

*Результаты.* 73,26±6,47% ( $p<0,05$ ) исследованных штаммов способны к образованию биоплёнок с различной способностью: 41,71±7,21% ( $p<0,05$ ) – слабая, 24,06±6,25% ( $p<0,05$ ) – умеренная, 7,49±3,85% ( $p<0,05$ ) – выраженная способность. Биоплёнки достоверно чаще формируют штаммы, обнаруженные в смывах со стен душевых, по сравнению со штаммами, обнаруженными в смывах со стен зала бассейна.

*Выводы.* Результаты исследования свидетельствуют о наличии способности к формированию биоплёнок у большинства микроорганизмов, выявляемых в составе биоценозов плавательных бассейнов. Способность микроорганизмов к формированию биоплёнок необходимо учитывать при планировании/корректировке санитарно-противоэпидемических мероприятий в плавательных бассейнах.

**Ключевые слова:** плавательные бассейны, биоценоз, биоплёнки.

*Для цитирования:* Пугач, В. В. Характеристика способности к формированию биоплёнок микроорганизмами, входящими в состав биоценозов плавательных бассейнов / В. В. Пугач, В. А. Горбунов // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2020. Т. 18, № 1. С. 35-38. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-1-35-38>

### Введение

Повышенная влажность окружающей среды плавательных бассейнов (ПБ) является благоприятным условием для сохранения большого разнообразия микроорганизмов, в том числе обладающих патогенным потенциалом.

Один из механизмов, позволяющий условно-патогенным микроорганизмам адаптироваться к неблагоприятным условиям и агрессивным факторам окружающей среды, – это способность к формированию биоплёнок (БП), сообществ микроорганизмов, заключенных в матрикс внеклеточных полимеров, имеющих измененный фенотип, проявляющийся отличными от стандартных параметрами роста и экспрессии специфических генов [1-3]. На сегодняшний день общепризнан тот факт, что существование микроорганизмов в форме БП существенно повышает их резистентность к антимикробным средствам, что может стать причиной значительного медицинского, социального и экономического ущерба [4-6].

В плавательных бассейнах имеются предпосылки для накопления широкого спектра микроорганизмов, в том числе клинически значимых, что в сочетании с наличием у них способности к формированию БП может привести к снижению эффективности проводимых дезинфекционных мероприятий и увеличению вероятности инфицирования посетителей ПБ.

**Цель исследования** – охарактеризовать способность к формированию БП микроорганизмами, входящими в состав биоценозов ПБ.

### Материал и методы

Материалом для проведения исследования послужили 187 штаммов микроорганизмов, выделенных из проб воды (из глубины 1 см и 25 см), смывов с поверхностей помещений (душевые, зал бассейна) и технологического оборудования ПБ (ножные ванны, чаша бассейна), среди которых были представители родов *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Kocuria*, *Enterobacter*, *Candida* и прочие.

Отбор проб воды и смывов осуществлялся в соответствии с действующими нормативно-правовыми актами Республики Беларусь [7-9]. Идентификация микроорганизмов проводилась по совокупности культуральных и морфологических признаков, а также на основании исследования их биохимической активности [10].

Для реализации цели настоящего исследования использована методика оценки способности микроорганизмов к формированию БП при помощи 96-луночных полистироловых планшетов и раствора генцианвиолета [1-2]. Измерение оптической плотности элюированного этанолом красителя осуществлялось на планшетном ридере Bio-Tek EL 800 (Bio-Tek Instruments, США) при длине волны 540 нм. Математическая и статистическая обработка результатов выполнялась средствами Microsoft Excel 2010, а также пакета для статистической обработки данных Statistica 10.

**Результаты и обсуждение**

В структуре исследованных микроорганизмов  $45,99 \pm 7,28\%$  ( $n=86$ ,  $p<0,05$ ) приходилось на долю грамположительных бактерий,  $50,80 \pm 7,32\%$  ( $n=95$ ,  $p<0,05$ ) – на долю грамотрицательных микроорганизмов,  $3,21 \pm 1,29\%$  ( $n=6$ ,  $p<0,05$ ) – на долю дрожжеподобных грибов. В структуре грамположительных микроорганизмов доминировали представители рода *Staphylococcus* ( $43,48 \pm 10,34\%$ ,  $n=40$ ,  $p<0,05$ ), в то время как в структуре грамотрицательных микроорганизмов превалировала группа неферментирующих грамотрицательных бактерий ( $88,42 \pm 6,56\%$ ,  $n=84$ ,  $p<0,05$ ), среди которых преобладающим видом была *Sphingomonas paucimobilis* ( $29,76 \pm 9,98\%$ ,  $n=25$ ,  $p<0,05$ ) [11].

У 137 ( $73,26 \pm 6,47\%$ ,  $p<0,05$ ) из исследованных 187 штаммов микроорганизмов выявлена способность к формированию БП, в том числе у 78 штаммов ( $41,71 \pm 7,21\%$ ,  $p<0,05$ ) выявлена слабая, у 45 ( $24,06 \pm 6,25\%$ ,  $p<0,05$ ) – умеренная, а у 14 ( $7,49 \pm 3,85\%$ ,  $p<0,05$ ) – выраженная способность. Информация о распределении штаммов, не формирующих БП, и формирующих БП разной степени выраженности, в зависимости от вида образцов, в которых они были выявлены, представлена в таблице 1.

Следует отметить, что способные к формированию БП штаммы микроорганизмов достоверно чаще выявлялись в смывах со стен душевых, чем в смывах со стен зала ПБ ( $77,05 \pm 10,76\%$ ,  $n=47$ ,  $p<0,05$  и  $46,67 \pm 25,76\%$ ,  $n=7$ ,  $p<0,05$ , соответственно).

Информация о вкладе грамположительных, грамотрицательных бактерий, а также дрожжеподобных грибов в структуру групп микроорганизмов с разной способностью к формированию БП представлена в таблице 2.

Среди исследованных 86 штаммов грамположительных бактерий 22 штамма ( $25,58 \pm 4,7\%$ ,  $p<0,05$ ) оказались не способны к формированию БП, у 42 штаммов ( $48,84 \pm 5,39\%$ ,  $p<0,05$ ) выявлена слабая, у 19 ( $22,09 \pm 4,47\%$ ,  $p<0,05$ ) штаммов – умеренная, а у 3 ( $3,49 \pm 1,98\%$ ,  $p<0,05$ ) штаммов – выраженная способность к формированию биоплёнок. Представители доминирующего в данной группе микроорганизмов рода *Staphylococcus* по сравнению со штаммами прочих грамположительных бактерий достоверно чаще формировали слабовыраженные БП –  $65,0 \pm 15,08\%$  ( $n=26$ ,  $p<0,05$ ) и  $34,78 \pm 14,04\%$  ( $n=16$ ,  $p<0,05$ ), соответственно.

Среди исследованных 95 штаммов грамотрицательных бактерий 27 штаммов ( $28,42 \pm 9,26\%$ ,

**Таблица 1.** – Распределение выявленных штаммов микроорганизмов по группам с разной способностью к формированию БП в зависимости от вида образцов, в которых они были выявлены

**Table 1.** – Distribution of microorganisms' strains into groups with different ability to form biofilms according to the type of specimen, where they were found

Вид образца	Не формируют БП		Слабая способность		Умеренная способность		Выраженная способность		Итого:
	Абс., шт.	Отн., %	Абс., шт.	Отн., %	Абс., шт.	Отн., %	Абс., шт.	Отн., %	
Вода (1 см)	2	4,00	5	6,41	4	8,89	0	0,00	11
Вода (25 см)	2	4,00	5	6,41	1	2,22	0	0,00	8
Ножные ванны	14	28,00	28	35,90	13	28,89	3	21,43	58
Стены душевых	14	28,00	25	32,05	19	42,22	3	21,43	61
Стены зала бассейна	8*	16,00	4	5,13	2	4,44	1	7,14	15
Чаша бассейна	10	20,00	11	14,10	6	13,33	7*	50,00	34
Итого:	50	100,00	78	100,00	45	100,00	14	100,00	187

Примечание: \* – различия с аналогичными показателями группы «Стены душевых» достоверны ( $p<0,05$ ); при определении достоверности различий использовались критерий  $\chi^2$  и точный критерий Фишера

**Таблица 2.** – Распределение выявленных штаммов микроорганизмов по группам с разной способностью к формированию БП в зависимости от их таксономической принадлежности

**Table 2.** – Distribution of microorganisms' strains into groups with different ability to form biofilms according to their taxonomy

Таксономическая группа	Не формируют БП		Слабая способность		Умеренная способность		Выраженная способность	
	Абс., шт.	Отн., %	Абс., шт.	Отн., %	Абс., шт.	Отн., %	Абс., шт.	Отн., %
Грамположительные бактерии	22	44,00	42	53,85	19	42,22	3	21,43
Грамотрицательные бактерии	27	54,00	35	44,87	23	51,11	10	71,43
Дрожжеподобные грибы	1	2,00	1	1,28	3	6,67	1	7,14
Итого:	50	100,00	78	100,00	45	100,00	14	100,00

Примечание: статистически значимых различий не выявлено ( $p<0,05$ ); при определении достоверности различий использовались критерий  $\chi^2$  и точный критерий Фишера

$p < 0,05$ ) оказались не способны к формированию БП, у 35 штаммов ( $36,84 \pm 9,9\%$ ,  $p < 0,05$ ) выявлена слабая, у 23 ( $24,21 \pm 8,78\%$ ,  $p < 0,05$ ) штаммов – умеренная, а у 10 ( $10,53 \pm 6,3\%$ ,  $p < 0,05$ ) штаммов – выраженная способность к формированию биоплёнок. Бактерии рода *Acinetobacter* по сравнению с другими грамотрицательными микроорганизмами достоверно чаще обладали выраженной способностью к формированию БП –  $33,33 \pm 22,22\%$  ( $n=6$ ,  $p < 0,05$ ) и  $5,19 \pm 2,53\%$  ( $n=4$ ,  $p < 0,05$ ), соответственно. *Acinetobacter spp.* также достоверно реже демонстрировали слабую способность к формированию БП по сравнению с другими выявленными грамотрицательными бактериями –  $11,11 \pm 14,82\%$  ( $n=2$ ,  $p < 0,05$ ) и  $42,86 \pm 11,28\%$  ( $n=33$ ,  $p < 0,05$ ), соответственно. Выявленные штаммы *Sphingomonas paucimobilis*, напротив, достоверно чаще формировали слабовыраженную биоплёнку по сравнению с прочими грамотрицательными бактериями –  $60 \pm 19,6\%$  ( $n=15$ ,  $p < 0,05$ ) и  $28,57 \pm 10,8\%$  ( $n=20$ ,  $p < 0,05$ ), соответственно.

### Выводы

Результаты исследования свидетельствуют о наличии способности к формированию БП у большинства микроорганизмов, выявляемых в составе биоценозов ПБ.

Достоверно более высокая вероятность выявления формирующих БП штаммов микроорганизмов на стенах душевых по сравнению со стенами зала бассейна может быть обусловлена тем, что параметры микроклимата душевых обуславливают наличие приближенных к оптимальным условиям для формирования БП. В зале бассейна параметры микроклимата постоянно поддерживаются на относительно стабильном уровне, что позволяет подобрать необходимый режим дезинфекции поверхностей помещения и строго следовать ему. Функциональное назна-

чение помещения предполагает сравнительно меньшее видовое разнообразие и количество микроорганизмов, входящих в состав биоценозов зала ПБ, что позволяет проводить дезинфекцию реже, чем в душевых. Таким образом, микроорганизмы, находящиеся на стенах душевых, в большей степени подвергаются агрессивному воздействию окружающей среды (использование дезинфектантов), что способствует селекции более адаптированных микроорганизмов и уменьшению доли не способных к формированию БП штаммов в популяции.

Штаммы микроорганизмов, выявленные в смывах с чаши ПБ, достоверно чаще, чем штаммы, выявленные в смывах со стен зала бассейна, обладали выраженной способностью к формированию БП, что также может являться следствием адаптации к среде обитания (граница раздела фаз «вода-воздух») и ее агрессивным факторам (остаточные количества дезинфицирующих средств в воде).

Несмотря на то, что у  $41,71 \pm 7,21\%$  исследованных штаммов выявлена слабая способность к формированию БП, у третьей их части ( $31,55 \pm 3,4\%$ ) обнаружена умеренная или выраженная способность к формированию БП. Снижение эффективности проводимых дезинфекционных мероприятий и более длительная персистенция, накопление микроорганизмов, в том числе обладающих патогенным потенциалом, в количествах, достаточных для инфицирования посетителей ПБ, ввиду выявленных особенностей в формировании БП представителями микробиоценозов ПБ и их распределения является неблагоприятным фактором. Необходимо проведение дальнейших исследований по оценке рисков для здоровья населения, ассоциированных с микробиологическим фактором при посещении ПБ.

### Литература

1. Биоплёнки : основные методы исследования / А. М. Марданова [и др.] ; под ред. О. Н. Ильинской. – Казань : К(П)ФУ, 2016. – 42 с.
2. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci / S. Stepanović [et al.] // APMIS. – 2007. – Vol. 115, iss. 8. – P. 891-899. – doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x.
3. Vtetz, V. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies / V. Ttetz // Med. Microbiol. Lett. – 1996. – Vol. 5, iss. 8. – P. 426-436.
4. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review / A. Bridier [et al.] // Biofouling. – 2011. – Vol. 27, iss. 9. – P. 1017-1032. – doi: 10.1080/08927014.2011.626899.
5. Mah, T. F. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents / T. F. Mah, G. A. O'Toole // Trends in microbiology. – 2001. – Vol. 9, iss. 1. – P. 34-39. – doi: 10.1016/s0966-842x(00)01913-2.
6. Simões, M. A review of current and emergent biofilm control strategies / M. Simões, L. C. Simões, M. J. Vieira // LWT - Food Science and Technology. – 2010. – Vol. 43, iss. 4. – P. 573-583. – doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.008.
7. ГОСТ Р 31861-2012. Вода. Общие требования к отбору проб [Электронный ресурс]. – Взамен Р 51592-2000 ; введ. 2014-01-01. – Москва : ФГУП, Стандартинформ. – 63 с. – Режим доступа: <http://www.nr-ciz.ru/userfiles/31861-2012.pdf>.
8. ГОСТ Р 51593-2001. Вода питьевая. Отбор проб [Электронный ресурс]. – Введ. 2002-11-01. – Москва : ФГУП, Стандартинформ. – Режим доступа: <https://files.stroyinf.ru/Index2/1/4293739/4293739312.htm>.
9. Об утверждении Санитарных норм, правил и гигиенических нормативов «Гигиенические требования к устройству, оборудованию и эксплуатации плавательных бассейнов и аквапарков»: постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 22 сент. 2009 г., № 105 // Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь. – Минск, 2012. – 8/25606.
10. Методы санитарно-микробиологического контроля воды плавательных бассейнов : инструкция по применению № 070-0210 : утверждена Министерством здравоохранения Республики Беларусь 19.03.2010 / В. П. Филонов [и др.] ; ГУ «Республиканский научно-практический центр гигиены». – Минск, 2010.
11. Пугач, В. В. Видовая структура микроорганизмов, входящих в состав микробиоценозов плавательных бассейнов / В. В. Пугач // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2019. – Т. 18, № 5. – С. 35-44. – doi: 10.22263/2312-4156.2019.5.35.



## References

- Mardanov AM, Kabanov DA, Rudakova NL, Sharipova MR, Ilinskaja ON, editor. Biopljonki: osnovnye metody issledovaniya. Kazan: K(P)FU; 2016. 42 p. (Russian).
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, Ruzicka F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007;115(8):891-899. doi: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_630.x.
- Tetz VV. The effect of antimicrobial agents and mutagen on bacterial cells in colonies. *Med. Microbiol. Lett.* 1996;5(8):426-436.
- Bridier A, Briand R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*. 2011;27(9):1017-1032. doi: 10.1080/08927014.2011.626899.
- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*. 2001;9(1):34-39. doi: 10.1016/s0966-842x(00)01913-2.
- Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*. 2010;43(4):573-583. doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.008.
- GOST R 31861-2012. Water. General requirements for sampling [Internet]. Moscow: FSUE, Standartinform. 63 p. Available from: <http://www.np-ciz.ru/userfiles/31861-2012.pdf>. (Russian).
- GOST R 51593-2001. Drinking water. Sampling [Internet]. Moscow: FSUE, Standartinform. Available from: <https://files.stroyinf.ru/Index2/1/4293739/4293739312.htm>. (Russian).
- Ministerstvo zdavoohraneniya Respubliki Belarus. Ob utverzhdenii Sanitarnykh norm, pravil i gigienicheskikh normativov "Gigienicheskie trebovaniya k ustrojstvu, oborudovaniju i jekspluatacii plavatelnykh bassejnov i akvaparkov". Postanovlenie № 105 (Sept. 22, 2009). *Nacionalnyj reestr pravovykh aktov Respubliki Belarus*. 2012;8/25606. (Russian).
- Filonov VP, Zastenskaja IA, Melnikova LA, Dudchik NV, Treshkova TS, Trejlib VV, Shedikova OE, inventors; Respublikanskij nauchno-prakticheskij centr gigieny. Metody sanitarno-mikrobiologicheskogo kontrolya vody plavatelnykh bassejnov. Instrukcija po primeneniju BY № 070-0210. 19.03.2010. Minsk; 2010. (Russian).
- Pugach VV. Vidovaja struktura mikroorganizmov, vhodjashchih v sostav mikrobiocenozov plavatelnykh bassejnov [Species composition of microorganisms being a part of microbiocenosis of the swimming-pools]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2019;18(5):35-44. doi: 10.22263/2312-4156.2019.5.35. (Russian).

## CHARACTERIZATION OF BIOFILM FORMATION ABILITY IN MICROORGANISMS BELONGING TO SWIMMING POOLS' BIOCENOSES

*Pugach V. V., Gorbunov V. A.*

*Republican Research and Practical Centre for Epidemiology and Microbiology, Minsk, Belarus*

*Background. Ability of representatives of swimming pools' microbiocenoses to form biofilms is a parameter, significant for swimming pool visitors' health risk assessment.*

*The aim of the research was to characterize the ability to form biofilms by microorganisms, constituting swimming pools' biocenoses.*

*Material and methods. The ability of 187 strains of microorganisms to form biofilms was investigated by a standard procedure. Results. A total of 73.26±6.47% (p<0.05) of the investigated strains were able to form biofilms with different ability: 41.71±7.21% (p<0.05) – weak ability; 24.06±6.25% (p<0.05) – moderate ability; 7.49±3.85% (p<0.05) – strong biofilm producers. Biofilm producing strains were significantly more often found among microorganisms, isolated from shower room walls, than among those isolated from swimming pool hall's walls.*

*Conclusions. The results of the study indicate the presence of the ability to form biofilms in most microorganisms detected in the biocenoses of swimming pools. The ability to form biofilms should be taken into account while planning/correcting sanitary measures in swimming pools.*

**Keywords:** *swimming pools, biocenosis, biofilms.*

**For citation:** *Pugach VV, Gorbunov VA. Characterization of biofilm formation ability in microorganisms belonging to swimming pools' biocenoses. Journal of the Grodno State Medical University. 2020;18(1): 35-38. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-1-35-38>.*

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the local ethics committee.

**Об авторах / About the authors**

\*Пугач Валентин Валентинович / Pugach Valentin, e-mail: [valeomed@mail.ru](mailto:valeomed@mail.ru), ORCID: 0000-0001-8023-682X  
Горбунов Владимир Анатольевич / Gorbunov Vladimir, e-mail: [gorbunov@belriem.by](mailto:gorbunov@belriem.by), ORCID: 0000-0002-4120-7863

\* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 27.11.2019

Принята к публикации / Accepted for publication: 17.01.2020