



<http://dx.doi.org/10.15407/dopovidi2016.05.080>

УДК 628.1+579.22

Академик НАН Украины В. В. Гончарук, М. Н. Сапрыкина,
Е. С. Болгова

Институт коллоидной химии и химии воды им. А. В. Думанского НАН Украины, Киев
E-mail: ebolgova88@gmail.com

Новые подходы к оценке обеззараживания питьевой воды

Исследовано влияние NaOCl на клетки Escherichia coli и Candida albicans с целью обнаружения их жизнеспособного некультурабельного состояния. Проведена реабилитация клеток, предварительно подвергшихся стресс-фактору. Подтверждена возможность образования жизнеспособного некультурабельного состояния клеток Candida albicans, окрашенных трипановым синим в процессе микроскопических исследований.

Ключевые слова: вода, питательные среды, стресс-фактор, жизнеспособное некультурабельное состояние, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.

Поверхностные воды содержат различные бактерии, вирусы, простейшие, а также микроскопические водоросли и грибы.

Микроскопические грибы — микромицеты, широко распространены в окружающей среде. Видовой состав и свойства отдельных видов не остаются постоянными и активно реагируют на изменения окружающей среды. Последние несколько десятилетий отмечаются резким увеличением отрицательных техногенных факторов на все экологические показатели состояния окружающей среды, в том числе и на микроскопические грибы, в результате чего они становятся опасными для здоровья и жизнедеятельности человека [1].

Микроскопические грибы могут поражать практически все органы и системы человека, животных, птиц, рыб, насекомых. Наиболее часто микозы развиваются у людей, больных диабетом, туберкулезом, онкологических и гематологических больных, ожоговых больных, реципиентов различных органов, ВИЧ-инфицированных.

Последние десятилетия большое внимание уделяется обнаружению микроскопических грибов как в поверхностных источниках водоснабжения, так и водопроводной воде [2, 3]. Установлено широкое распространение микроскопических грибов в источниках водоснабжения Украины [4]. Показано, что дрожжеподобные грибы рода *Candida* являются наиболее

часто встречаемым видом в пробах анализируемой поверхностной воды, а их количество колеблется в пределах от $1 \cdot 10^2$ до 10^5 КОЕ/100 см³ [5].

Процесс очистки воды на станциях водоподготовки по микологическому критерию позволяет удалить значительное количество грибов из воды. Однако в результате вторичного загрязнения воды в водопроводной сети потребитель, как правило, получает некачественную водопроводную воду. Среди опасных для здоровья человека видов микромицетов выделены: *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium cladosporioides*, которые способны вызывать аспергиллез, оппортунистические инфекции, респираторные инфекции, пневмонии, кератиты, гранулемы и др. [3, 6].

До настоящего времени при оценке качества воды по микробиологическим показателям исследователи ориентируются на наличие клеток *Escherichia coli*, некоторых вирусов и простейших. Нами показано, что данные микроорганизмы являются менее устойчивыми к существующим методам обеззараживания, чем микроскопические грибы.

Так, для инактивации на один порядок от исходного количества грибов *Candida albicans* необходимая доза УФ-излучения составляет 24 мДж/см², в то время как для санитарно-показательного микроорганизма *E. coli* она равна 5 мДж/см². При использовании озона в качестве дезинфектанта установлено, что доза растворенного в воде реагента, необходимая для инактивации четырех порядков культуры *E. coli*, составляет 0,04 мг/дм³, тогда как для *C. albicans* эта степень обеззараживания достигается при дозе поглощенного озона 3 мг/дм³. Применение NaOCl, как одного из наиболее широко используемых дезинфектантов, также требует повышенных доз реагента для удаления микромицетов в сравнении с санитарно-показательным микроорганизмом *E. coli*. Так, инактивация одного порядка культуры *E. coli* с исходным количеством $1 \cdot 10^5$ КОЕ/см³ достигается при концентрации NaOCl 0,1 мг/дм³, тогда как увеличение этой концентрации в пять раз не приводит к аналогичному эффекту в случае с *C. albicans* [4, 7].

Поэтому при оценке качества обеззараживания питьевой воды классическими методами целесообразно в качестве дополнительной тест-культуры использовать клетки *C. albicans*, отсутствие которых будет свидетельствовать об удалении менее устойчивых форм микроорганизмов.

Кроме того, длительный контакт микроорганизмов с обеззараживающими агентами способствует их переходу в жизнеспособное некультурабельное состояние, при котором клетка не растет на классических средах, однако остается жизнеспособной [8, 9]. В случае установления оптимальных условий для роста и развития клетка возвращается в культурабельное состояние, сохраняя свои патогенные свойства [10]. Наличие микроорганизмов в жизнеспособном некультурабельном состоянии увеличивает вероятность получить ложноотрицательный результат лабораторных исследований стандартизированными методами, что уже имело место в Новосибирске, когда вода, соответствовавшая ГОСТ 2874–82, привела к появлению кишечных заболеваний у населения города [11, 12].

Такое состояние известно для ряда микроорганизмов: *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Campylobacter jejuni* и др. [8].

Поэтому возникает необходимость установить возможность образования некультурабельного состояния у санитарно-показательного микроорганизма *E. coli* и *C. albicans*, как наиболее часто встречаемого в поверхностных источниках водоснабжения и водопроводной воде, а также определить условия реактивации этих клеток.

На основании проведенных исследований установлено, что при воздействии NaOCl (стресс-фактор) в концентрациях 2–3 мг/дм³ на культуру *E. coli* 1257 образуются кле-

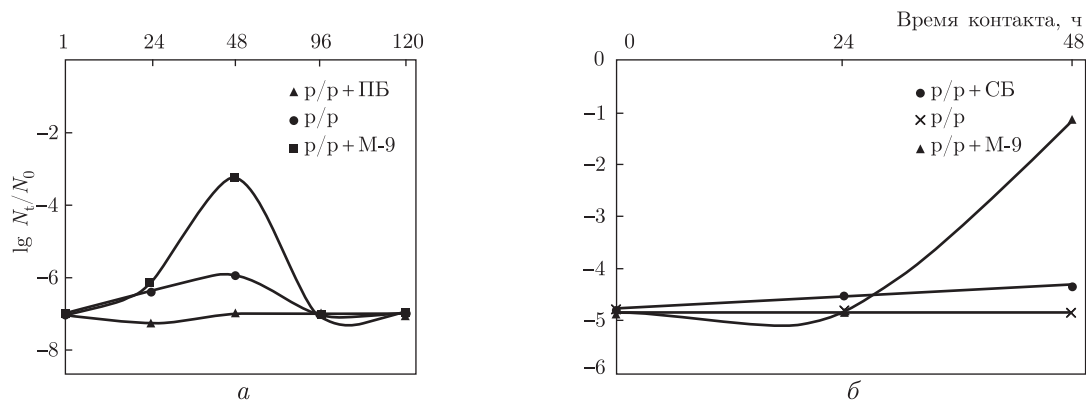


Рис. 1. Кинетика восстановления культур *E. coli* после контакта с NaOCl в концентрации 2 мг/дм³ (а) и *C. albicans* после контакта с NaOCl в концентрации 5 мг/дм³ (б). Рабочий раствор (р/р) — клетки культуры, которые пребывали под воздействием стресс-фактора (NaOCl)

тки в жизнеспособном некультурабельном состоянии, которые не определяются общепринятыми методами, однако при попадании в оптимальные условия способны возвращаться в культурабельное состояние уже через сутки. Дополнительное использование питательной среды М-9 способствует более быстрому восстановлению и росту бактериальных клеток *E. coli* 1257 (рис. 1, а).

Выделенная культура *E. coli* 1257, которая пребывала в жизнеспособном некультурабельном состоянии, не стала более устойчивой к NaOCl в концентрациях 2 и 3 мг/дм³, что, вероятно, свидетельствует об отсутствии генетических изменений в клетке при действии на нее стресс-фактора.

Также установлено, что *C. albicans* при воздействии на нее NaOCl в концентрации 5 мг/дм³ способна переходить в жизнеспособное некультурабельное состояние и при оптимальных условиях роста (в жидкой среде Сабуро или среде М-9) восстанавливаться до нормального культурабельного состояния (см. рис. 1, б). Оптимальная температура восстановления культур *E. coli* и *C. albicans* — 37 и 27 °С, а время термостатирования — 24 и 48 ч соответственно.

При оценке влияния NaOCl на клетки *C. albicans* в исходной форме, а также в жизнеспособном некультурабельном состоянии нами обнаружено незначительное увеличение устойчивости последних. Однако полученные результаты требуют проведения дальнейших более детальных исследований.

Методом прямой микроскопии подтверждено наличие клеток *C. albicans* в жизнеспособном некультурабельном состоянии после воздействия на них бактерицидных концентраций (5 мг/дм³) NaOCl. Эти клетки оставались неокрашенными красителем трипановым синим, что свидетельствует об их жизнеспособности, однако при посеве такой культуры на классическую микробиологическую среду Сабуро ее рост отсутствовал (рис. 2). Предварительное внесение культуры в жидкую среду Сабуро или М-9 перед посевом на чашку Петри способствовало восстановлению и росту культуры на вторые сутки.

Полученные результаты указывают на необходимость внесения изменений в методику определения качества воды, поступающей к потребителю, что включает в себя дополнительное использование в качестве тест-культуры клеток *C. albicans*, отсутствие которых в анализируемом образце воды будет свидетельствовать об инактивации других, менее устойчивых форм микроорганизмов, в том числе и санитарно-показательного *E. coli*.

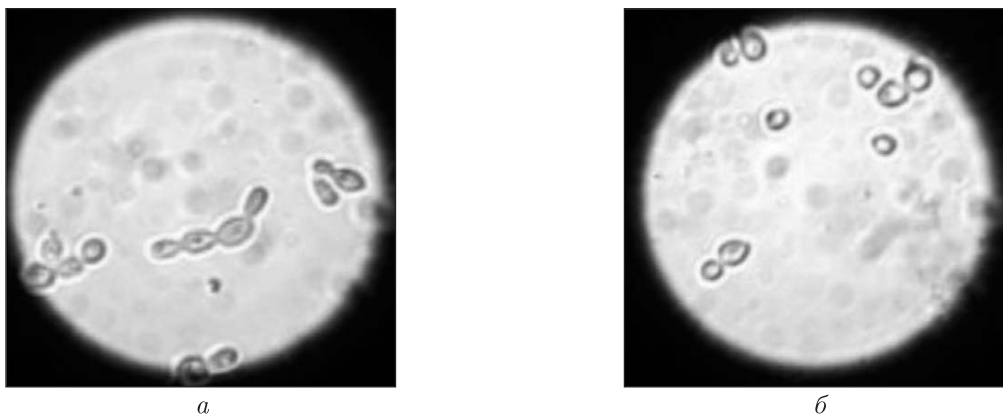


Рис. 2. Клетки *C. albicans* в жизнеспособном некультурабельном состоянии, окрашенные трипановым синим: *а* — клетки после действия стресс-фактора; *б* — после реабилитации в питательной среде М-9

На основании результатов исследования можно сделать вывод о целесообразности включения в методику определения качества воды дополнительного этапа культивирования в синтетической питательной среде М-9 с последующим высевом исследуемой пробы воды на классические среды или проведением микроскопических исследований окрашенных образцов воды.

Цитированная литература

1. Schültze N., Lehmann I., Bönisch U., Simon J. C., Polte T. Exposure to mycotoxins increases the allergic immune response in a murine asthma model // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2010. – **181**, No 11. – P. 1188–1199.
2. Hageskal G., Lima N., Skaar I. The study of fungi in drinking water // *Mycol. Res.* – 2009. – **113**. – P. 165–172.
3. Гончарук В. В., Руденко А. В., Савлук О. С., Коваль Є. З., Сапрыкіна М. М. Мікроміцети в питній воді та шляхи її знезараження // *Доп. НАН України.* – 2008. – № 11. – С. 187–191.
4. Гончарук В. В., Руденко А. В., Савлук О. С., Сапрыкіна М. Н. Мікроміцети в источниках водоснабжения и водопроводной воде // *Вода: гігієна та екологія.* – 2013. – **1**, № 2. – С. 34–48.
5. Rudenko A. V., Savluk O. S., Saprykina M. N., Yastremskaya A. V., Goncharuk V. V. Microscopic fungi in water of the Dnieper river // *J. Water Chem. Tech.* – 2011. – **33**, No 5. – P. 323–327.
6. Liu Y., Gulchrist A., Zhang J., Li X.-F. Detection of viable but nonculturable *Escherichia coli* 0157: H7 bacteria in drinking water and river water // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2008. – **74**, Iss. 5. – P. 1502–1507.
7. Saprykina M. N., Samsoni-Todorov A. O., Todorov V. V. The decontamination effect of UV radiation with respect to micromycetes // *J. Water Chem. Tech.* – 2009. – **31**, No 5. – P. 329–333.
8. Юдин И. П. Современные подходы к оценке жизнеспособности бактерий с акцентом на феномене некультурабельности // *Annals of Mechnicov Institute.* – 2007. – № 3. – С. 8–16.
9. Smith B., Oliver J. D. In Situ and In Vitro Gene Expression by *Vibrio vulnificus* during Entry into, Persistence within, and Resuscitation from the viable but nonculturable state // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – **72**, Iss. 2. – P. 1445–1451.
10. Alleron L., Khemiri A., Koubar M., Lacombe C., Coquet L., Cosette P., Jouenne T., Frere J. VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins // *Water Res.* – 2013. – **47**. – P. 6606–6617.
11. Воронкіна І. А. Деякі питання гострих кишкових інфекцій та мікроекології // *Аналі Мечниковського інституту.* – 2006. – № 3. – С. 56–60.
12. Мокієнко А. В. Вода: к взаимосвязи гигиены и экологии // *Вода: гігієна и екологія.* – 2013. – **1**, № 1. – С. 20–34.

References

1. Schültze N., Lehmann I., Bönisch U., Simon J. C., Polte T. Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2010, **181**, No 11: 1188–1199.
2. Hageskal G., Lima N., Skaar I. Mycol. Res., 2009, **113**: 165–172.
3. Goncharuk V. V., Rudenko A. V., Savluk O. S., Koval E. Z., Saprykina M. N. Dop. NAN Ukraine, 2008, **11**: 187–191 (in Ukrainian).
4. Goncharuk V. V., Rudenko A. V., Savluk O. S., Saprykina M. N. Water: hygiene and ecology, 2013, **1**, No 2: 34–48 (in Russian).
5. Rudenko A. V., Savluk O. S., Saprykina M. N., Yastremskaya A. V., Goncharuk V. V. J. Water Chem. Techn., 2011, **33**, No 5: 323–327.
6. Liu Y., Gülchrist A., Zhang J., Li X.-F. Appl. Environ. Microbiol., 2008, **74**, No 5: 1502–1507.
7. Saprykina M. N., Samsoni-Todorov A. O., Todorov V. V. J. Water Chem. and Tech., 2009, **31**, No 5: 329–333.
8. Yudin I. P. Annals of Mechnikov Institute, 2007, No 3: 8–16 (in Russian).
9. Smith B., Oliver J. D. Appl. Environ. Microbiol., 2006, **72**, Iss. 2: 1445–1451.
10. Alleron L., Khemiri A., Koubar M., Lacombe C., Coquet L., Cosette P., Jouenne T., Frere J. Water Res., 2013, **47**: 6606–6617.
11. Voronkina I. A. Annals of Mechnikov's Institute, 2006, No 3: 56–60 (in Ukrainian).
12. Mokiienko A. V. Water: hygiene and ecology, 2013, **1**, No 1: 20–34 (in Russian).

Поступило в редакцію 17.11.2015

Академік НАН України **В. В. Гончарук, М. М. Саприкіна, О. С. Болгова**

Інститут колоїдної хімії і хімії води ім. А. В. Думанського НАН України, Київ
E-mail: ebolgova88@gmail.com

Нові підходи до оцінки знезараження питної води

Досліджено вплив NaOCl на клітини *Escherichia coli* і *Candida albicans* з метою виявлення їх життєздатного некультивурабельного стану. Проведено реабілітацію клітин, що попередньо були під дією стрес-фактору. Підтверджено можливість утворення життєздатного некультивурабельного стану у клітин *Candida albicans*, пофарбованих трипановим синім у процесі мікроскопічних досліджень.

Ключові слова: вода, поживні середовища, стрес-фактор, життєздатний некультивурабельний стан, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.

Academician of the NAS of Ukraine **V. V. Goncharuk, M. N. Saprykina, E. S. Bolgova**

A. V. Dumansky Institute of Colloid and Water Chemistry of the NAS of Ukraine, Kiev
E-mail: ebolgova88@gmail.com

New approaches to the assessment of disinfection of drinking water

The effect of NaOCl on *Escherichia coli* and *Candida albicans* cells is studied in order to detect their viable but non-culturable state (VBNC). Cells pre-exposed to the stress factor have been rehabilitated. The presence of a viable but non-culturable state of *Candida albicans* cells stained with trypan blue in microscopic studies is confirmed.

Keywords: water, culture media, the stress factor, viable but non-culturable state, *Escherichia coli*, *Candida albicans*.