



<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 см<sup>3</sup> [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/см<sup>2</sup>, в то время как для санитарно-показательного микроорганизма *E. coli* она равна 5 мДж/см<sup>2</sup>. 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/дм<sup>3</sup>, тогда как для *C. albicans* эта степень обеззараживания достигается при дозе поглощенного озона 3 мг/дм<sup>3</sup>. 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/см<sup>3</sup> достигается при концентрации NaOCl 0,1 мг/дм<sup>3</sup>, 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/дм<sup>3</sup> на культуру *E. coli* 1257 образуются кле-

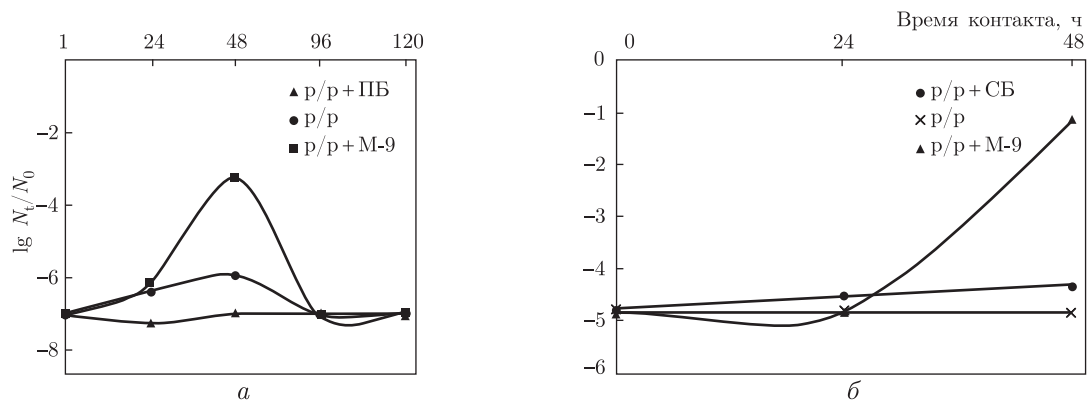


Рис. 1. Кинетика восстановления культур *E. coli* после контакта с NaOCl в концентрации 2 мг/дм<sup>3</sup> (а) и *C. albicans* после контакта с NaOCl в концентрации 5 мг/дм<sup>3</sup> (б). Рабочий раствор (р/р) — клетки культуры, которые пребывали под воздействием стресс-фактора (NaOCl)

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/дм<sup>3</sup>, 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/дм<sup>3</sup> 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/дм<sup>3</sup>) 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*.

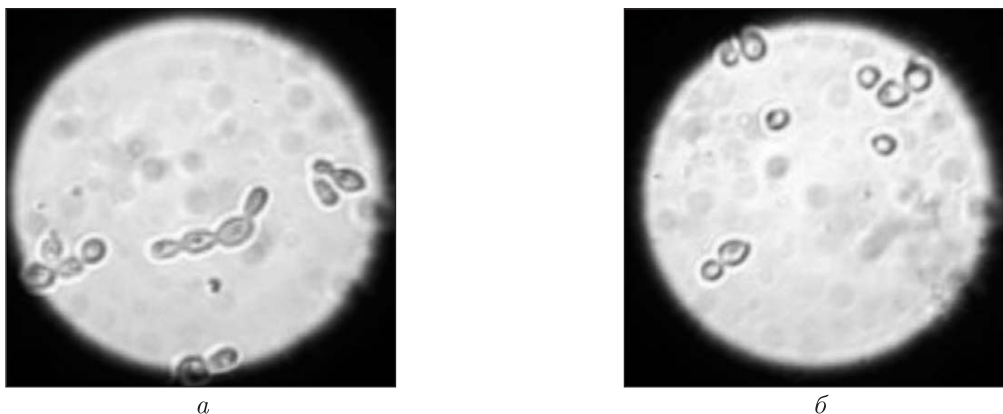


Рис. 2. Клетки *C. albicans* в жизнеспособном некультурабельном состоянии, окрашенные трипановым синим: *а* — клетки после действия стресс-фактора; *б* — после реабилитации в питательной среде М-9

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 водоснабження 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: гигиена и экология.* – 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*.