

В.В. Гончарук, А.В. Руденко, М.Н. Сапрыкина, Е.С. Болгова

**ВЫЯВЛЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, НАХОДЯЩИХСЯ
В НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОМ СОСТОЯНИИ
В ХЛОРИРОВАННОЙ ВОДЕ"**

Институт коллоидной химии и химии воды
им. А.В. Думанского НАН Украины, г. Киев
saprikina_m@ukr.net

*Изучено некультуральное состояние у санитарно-показательных микроорганизмов *Escherichia coli* и *Candida albicans* в результате обеззараживания воды хлором. Разработанный метод выявления таких микроорганизмов положен в основу Государственного стандарта Украины "Качество воды. Выявление микроорганизмов, находящихся в некультуральном состоянии в воде".*

Ключевые слова: качество воды, микроорганизмы, некультуральное состояние, обеззараживающие агенты.

Введение. Проблема водоснабжения населения высококачественной водой является одной из главных проблем человечества. По данным Всемирной организации здравоохранения около 80% заболеваний людей связаны именно с плохим качеством питьевой воды. Так, вода может быть источником распространения возбудителей многих инфекционных заболеваний, например брюшного тифа, паратифа А и В, холеры, дизентерии, сальмонеллеза, эшерихиоза и др.

Применение современных методов обеззараживания, используемых на станциях водоподготовки, не обеспечивает полной инактивации микроорганизмов, а способствует их трансформации в новое состояние, при котором они не определяются классическими микробиологическими методами анализа, но сохраняют свою жизнеспособность и патогенные свойства [1 – 3]. Биологическое обрастание внутренней поверхности водопроводных сетей возможно за счет наличия микроорганизмов, находящихся в жизнеспособном, однако некультуральном состоянии (ЖНС) в обеззараженной воде, которые не выяв-

© В.В. Гончарук, А.В. Руденко, М.Н. Сапрыкина, Е.С. Болгова, 2018

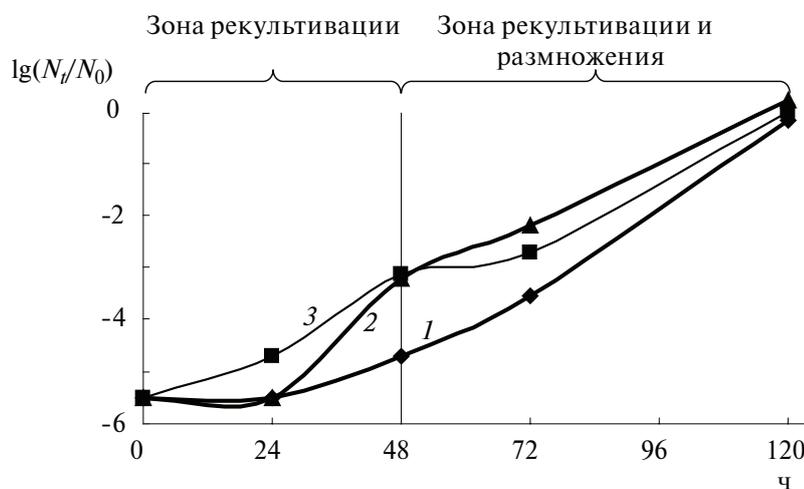


Рис. 4. Кинетика восстановления и роста *C. albicans*: 1 – p/p , 2 – $p/p + БС$, 3 – $p/p + М-9$.

Проявление роста инактивированной, согласно классическому микробиологическому методу выявления, культуры *C. albicans* (после культивирования в среде М-9 через 24 ч) свидетельствует об активном ее восстановлении в культурабельное состояние. Вероятно, такая тенденция связана с присутствием ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} в среде М9, которые жизненно необходимы клетке для ее нормального функционирования, поскольку являются кофакторами многих ферментов. Кроме того, известно, что кальций снижает мембранную проницаемость клетки для вредных веществ, а клетка, ослабленная действием стресс-фактора, пытается максимально быстро восстановиться [10].

В связи с тем, что уже на вторые сутки в самом p/p количество рекультивированных клеток возрастает ($1 - 10$ КОЕ/см³), то при его внесении в жидкие среды (М-9 или БС), содержащие питательные вещества, наблюдается как восстановление, так и репродукция *C. albicans* (соответственно $2,3 \cdot 10^2$ или $1,9 \cdot 10^2$ КОЕ/см³) (см. рис. 4, кривые 2, 3).

Поскольку установлено, что в p/p данная культура микроорганизмов также восстанавливается (особенно это заметно на вторые сутки термостатирования), то целесообразно было исследовать влияние температуры на восстановление микроорганизмов, пребывающих в некультурабельном состоянии. Так, *E. coli* восстанавливается быстрее при 37°C, чем при комнатной и низкой температурах (табл. 1). Очевидно, это связано с тем, что такая температура является оптимальной для роста и развития ее культурабельных клеток. Максимальная степень рекультивации *C. albicans*

наблюдается при 37 и 27°C, тогда как пониженная температура (9°C) не приводит к ее заметному восстановлению (табл. 2). Поэтому для достижения оптимальных условий рекультивации клеток *C. albicans* пробы воды со средой М-9 следует термостатировать при 27 или 37°C.

Таблица 1. Влияние температуры на кинетику роста *E. coli* 1257 после контакта с NaOCl

Проба	Т, °С								
	37			10–15			9		
	Продолжительность термостатирования, ч								
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
	КОЕ/см ³								
р/р	23	97	0	0	0	0	1	0	0
р/р + М-9	45	18000	160	0	0	0	0	0	0
р/р + ПБ	0	3	0	0	0	0	0	0	0

Таким образом, показано что культуры *E. coli* и *C. albicans* способны переходить в ЖНС под воздействием стресс-фактора – NaOCl. Установлено, что для их обнаружения после контакта с NaOCl целесообразно применить питательную среду М-9 перед посевом культуры на твердую дифференциально-диагностическую стандартную среду.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости внесения изменений в методику определения качества воды, поступающей к потребителю, а также разработки новых подходов к ее обеззараживанию.

Таблица 2. Влияние температуры на кинетику рекультивации и роста культуры *Candida albicans* после контакта с NaOCl

Проба	Т, °С					
	37		27		9	
	Продолжительность термостатирования, ч					
	24	48	24	48	24	48
	КОЕ/см ³					
р/р	0	5	0	6	0	0
р/р + М-9	2	180	8	230	0	3
р/р + БС	0	110	0	190	0	0

Разработанный в Институте коллоидной химии и химии воды им. А.В. Думанского НАН Украины метод выявления микроорганизмов, находящихся в некультурабельном состоянии в воде, положен в основу создания нормативного документа. Суть метода выявления микроорганизмов, находящихся в некультурабельном состоянии, заключается во внесении определенных объемов анализируемой воды в жидкую микробиологическую среду М-9 и культивировании ее в термостате в течение одних суток при 37°C. После чего пробы пропускают сквозь мембранные фильтры, которые размещают на поверхности питательной среды в чашки Петри, или прямо высевают в чашки Петри, содержащие соответствующие дифференциально-диагностические питательные среды: Сабуро с 2,6-дихлор-4-нитроанилином и Эндо с последующей их инкубацией, подсчетом и идентификацией выросших колоний [11].

Выводы. Таким образом, Государственный стандарт Украины "Качество воды. Выявление микроорганизмов, находящихся в некультурабельном состоянии в воде" позволит обнаружить в воде микроорганизмы, которые не культивируются на стандартных питательных средах, используемых для определения качества воды, однако при этом сохраняют жизнеспособность и патогенные свойства.

Указанный стандарт может использоваться для текущего контроля микробиологическими и микологическими подразделениями системы государственного мониторинга, специализированными центрами и измерительными лабораториями исследования воды, а также органами, осуществляющими надзор в сфере питьевого водоснабжения.

Внедрение в действие нормативного документа будет соответствовать международным требованиям и позволит контролировать важный параметр безопасности потребляемой воды человеком – количество и видовое разнообразие микроорганизмов, находящихся в некультурабельном состоянии. Следовательно, данный стандарт будет способствовать повышению безопасности питьевой воды и эффективности контроля ее качества, а также обеспечит возможность сравнивать результаты микробиологического анализа, полученные в разных странах мира, и способствовать повышению экологической безопасности.

Резюме. Встановлено можливість утворення некультурабельного стану у санітарно-показових мікроорганізмів *E. coli* та *C. albicans* в результаті знезараження води. Розроблено метод виявлення мікроорганізмів, що перебувають у некультурабельному стані, який покладено

в основу державного стандарту України "Якість води. Виявлення мікроорганізмів, що перебувають у некультивурабельному стані у воді".

V.V. Goncharuk, A.V. Rudenko, M.M. Saprykina, O.S. Bolgova

**THE DEVELOPING OF THE STATE STANDARD OF UKRAINE
"WATER QUALITY. IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS
IN AN UNCULTURABLE STATE IN WATER"**

Summary

The possibility of forming an unculturable state in the sanitary-demonstrative microorganism *E. coli* and *C. albicans* as a result of water disinfection has been established. A method for identifying microorganisms in an unculturable state was developed, which is the basis of the state standard of Ukraine "Water quality. Identification of microorganisms in an unculturable state in water".

Список использованной литературы

- [1] *Md. Fakruddin, Khanjada Shahnewaj Bin Mannan, S.Andrews // ISRN Microbiol. – 2013. – 2013. – P. 6.*
- [2] *Юдин И.П. // Annals of Mechnicov Institute. – 2007. – 3. – С. 8 – 16.*
- [3] *Smith B., Oliver J.D. // Appl. and Environ. Microbiol. – 2006. – 72, N2. – P. 1445 – 1451.*
- [4] *Alleron L., Khemiri A., Koubar M. et al. // Water Res. –2013. – 47. – P. 6606 – 6617.*
- [5] *Воронкіна І.А. // Аналі Мечніков. Ін-ту. – 2006.– 3. – С. 56 – 60.*
- [6] *Мокиєнко А.В. // Вода: гігієна і екологія.– 2013.– 1, №1.– С. 20 – 34.*
- [7] *Du Z., Nandakumar R., Nickerson K.W., Xu Li // Water Res. – 2015. – 69. – P. 110 – 119.*
- [8] *Saprykina M.M., Savluk O.S., Goncharuk V.V. // J. Water Chem. and Technol. – 2009. – 31, N1. – P. 60 – 65.*
- [9] *Hin-chung Wong, Peily Wang, Shau-Yan Chen, Shen-Wen Chiu. // FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – 233. – P. 269 – 275.*
- [10] *Davis L. Basic methods in molecular biology. – New York: Elsevier, 1986. – __ р.*
- [11] *Пат. 113472 Україна, МПК C12Q 1/04 / В.В. Гончарук, М.М. Саприкіна, О.С. Болгова. – Опубл. 25.01.2017, Бюл. № 2.*

Поступила в редакцію 10.07.2017 г.