

УДК 628.1+579.22

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

**ОБРАЗОВАНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОГО
НЕКУЛЬТУРАБЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
*CANDIDA ALBICANS***

Институт коллоидной химии и химии воды
им. А.В. Думанского НАН Украины, г. Киев
ebolgova88@gmail.com

Исследовано влияние NaOCl на клетки Candida albicans с целью обнаружения жизнеспособного некультурального состояния, а также условия их реабилитации. Проведены микроскопические исследования клеток Candida albicans в указанном состоянии, окрашенных трипановым синим.

Ключевые слова: водная среда, жизнеспособное некультуральное состояние, питательные среды, трипановый синий, *Candida albicans*.

Введение. Последние десятилетия большое внимание уделяется обнаружению микроскопических грибов как в поверхностных источниках водоснабжения, так и водопроводной воде [1]. Данная группа микроорганизмов способна вызывать тяжелые заболевания у людей, выделяя токсические вещества в субстрат, на/в котором находится [2].

В работе [3] установлено широкое распространение микроскопических грибов в источниках водоснабжения Украины. Показано, что дрожжеподобные грибы рода *Candida* являются наиболее часто встречаемым видом, а их количество колеблется в пределах от $1 \cdot 10^2$ до 10^5 КОЕ/100 см³ [4]. При анализе воды водораспределительных систем г. Киева обнаружено, что дрожжеподобные грибы встречаются повсеместно, а период эксплуатации трубопроводов незначительно влияет на количество микромицетов в воде [5].

Установлено, что использование классических методов обеззараживания воды не обеспечивает эффективного удаления этих микроорганизмов или требует повышенных доз реагентов. Показано [6],

© М.Н. Сапрыкина, Е.С. Болгова, В.В. Гончарук, 2016

что для инактивации одного порядка грибов *Candida albicans* необходимая доза УФ-излучения составляет 24 мДж/см², в то время как для санитарно-показательного микроорганизма *Escherichia coli* – 5 мДж/см². Доза растворенного в воде озона, необходимая для инактивации четырех порядков культуры *E. coli*, составляет 0,04 мг/дм³, тогда как для *C. albicans* достигает 3 мг/дм³. Среди классических методов обеззараживания воды в практике водоподготовки наиболее часто применяют соединения хлора. Для обеззараживания воды от одного порядка культуры *E. coli* концентрация NaOCl составляет 0,1 мг/дм³ при продолжительности контакта 60 мин, тогда как в случае с *C. albicans* повышение концентрации этого дезинфектанта до 0,5 мг/дм³ не позволяет достичь такой же степени инактивации культуры за указанное время контакта. Из изложенного следует, что культура дрожжеподобного гриба *C. albicans* является более устойчивой к классическим методам обеззараживания, чем санитарно-показательный микроорганизм – *E. coli*, а значит, может быть предложена в качестве тест-объекта при оценке их эффективности.

С другой стороны, установлено, что ряд микроорганизмов при действии на них различных стресс-факторов могут переходить в жизнеспособное некультурабельное состояние (ЖНС) [7]. Это такое состояние, при котором клетка не растет на классических средах, но остается жизнеспособной [8, 9]. Известно, что клетка при установлении оптимальных условий для роста и развития возвращается в культурабельное состояние, сохраняя свои патогенные свойства [10]. Наличие культуры в состоянии ЖНС увеличивает вероятность получить ложноотрицательный результат лабораторных исследований стандартизированными методами [11].

Поэтому целью данной работы является выявление ЖНС у клеток дрожжеподобных грибов после действия на них стресс-фактора – NaOCl как наиболее часто используемого реагента водоподготовки, и определение условий возвращения культуры *C. albicans* в нормальное культурабельное состояние.

Методика эксперимента. Для исследования была выбрана культура *C. albicans* 10231, которую получили из музея микроорганизмов Института эпидемиологии и инфекционных заболеваний им. Л.В. Грошевского АМН Украины.

Суспензию *C. albicans* готовили согласно [12]. Выживаемость микроорганизмов определяли по наличию КОЕ при посеве отобранных проб воды

на агаризированную среду Сабуро. Культивировали микроорганизмы в течение одних суток при 37°C. Результат выражали как соотношение логарифма концентрации тест-микроорганизма, который остался в растворе после обработки дезинфектантом (N_p), к исходному его количеству (N_0).

Оценку эффективности обеззараживания воды соединениями хлора проводили при использовании NaOCl в диапазоне концентраций от 0,5 до 5 мг/дм³. Для этого в стерильные флаконы, содержащие 20 см³ дистиллированной воды, добавляли определенное количество свежеприготовленной культуры *C. albicans*, чтобы нагрузка в рабочем растворе (р/р) составляла $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ КОЕ/см³, а также дезинфектанта. Пробы отбирали через 10; 30 и 60 мин. По истечении этого времени свободный хлор в р/ре связывали тиосульфатом натрия (0,1 М Na₂S₂O₃ · H₂O).

С целью обнаружения клеток *C. albicans* в некультурабельном состоянии р/р вносили в бульон Сабуро (БС) (оптимальная среда размножения и роста *C. albicans*) и в минимальную питательную среду М-9 в соотношении 1:10, а затем тщательно перемешивали. Пробирки с питательными средами, а также исходный р/р помещали в термостат при 37°C. Через 18 – 24 ч проводили их посева на твердую среду Сабуро, после чего чашки помещали в термостат.

Для определения кинетики роста жизнеспособных некультурабельных клеток *C. albicans* ежедневно в течение четырех – пяти суток р/р вносили в пробирки со средой М-9 или СБ. Затем пробы помещали в термостат, после чего их высевали на твердую питательную среду Сабуро, как описано выше.

Также было оценено влияние температуры на восстановление и рост клеток *C. albicans*, находящихся в жизнеспособном некультурабельном состоянии. Для этого культуру, инактивированную NaOCl при концентрации 3 мг/дм³, помещали в среду М-9 и БС в соотношении 1:10. Все пробы (р/р, р/р + М-9 и р/р + БС) выдерживали при 37; 25 – 27 и 5°C. Посевы проводили через каждые сутки.

Для идентификации живых, мертвых клеток и клеток в жизнеспособном некультурабельном состоянии применяли метод прямого микроскопирования. С этой целью был использован раствор трипанового синего (ТС), который готовили согласно [13].

Перед приготовлением препарата для микроскопии к культуре клеток и красителю добавляли диметилсульфоксид (CH₃)₂SO (бесцветная жидкость, важный биполярный апротонный растворитель) марки ПанЭко (США).

Результаты и их обсуждение. Поскольку *C. albicans* часто встречается как в поверхностных, так и водопроводных водах, а NaOCl длительное время используют в практике водоподготовки, то целесообразно было проверить вероятность перехода культуры *C. albicans* в ЖНС при контакте клеток с этим обеззараживающим агентом.

При проведении серии экспериментов установлено, что NaOCl имеет слабое фунгицидное действие, а для повышения степени обеззараживания возникает необходимость использования его повышенных доз. Так, при концентрации NaOCl 0,5 мг/дм³ наблюдается слабое обеззараживание воды от *C. albicans* с исходной нагрузкой $1,5 \cdot 10^4$ КОЕ/см³. В то же время рост концентрации гипохлорита натрия до 2,0; 3,0 и 5,0 мг/дм³ позволяет повысить степень инаktivации культуры до 4,5 порядков через 30 мин контакта (рис. 1). Для дальнейших исследований жизнеспособного, но некультурабельного состояния *C. albicans* выбрана концентрация NaOCl, составляющая 5 мг/дм³, которая имела выраженный бактерицидный эффект.

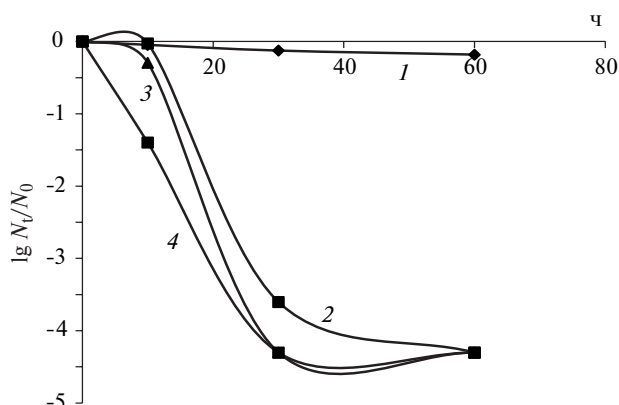


Рис. 1. Кинетика обеззараживания воды от *Candida albicans* при помощи NaOCl с концентрациями, мг/дм³: 0,5 (1); 2,0 (2); 3,0 (3); 5,0 (4).

Для реактивации клеток, находящихся в ЖНС, широко используют минимальную синтетическую среду М-9. Поэтому, чтобы вернуть некультурабельные клетки, ранее подвергшиеся действию стресс-фактора, в культурабельное состояние, а также определить оптимальные условия реактивации, в опытах, кроме общепринятого бульона Сабуро, использовали минимальную синтетическую среду М-9 с последующим высевом проб на твердую питательную среду Сабуро.

По полученным данным видно (рис. 2), что клетки после устранения стресс-фактора наиболее активно восстанавливаются в среде М9, тогда как в исходном р/ре и бульоне Сабуро отмечается наличие единичных колоний. Вероятно, такая тенденция связана с присутствием 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 [14]. Восстановление культуры наблюдается на вторые сутки. Таким образом, установлено, что культура *C. albicans* при воздействии на нее NaOCl переходит в ЖНС.

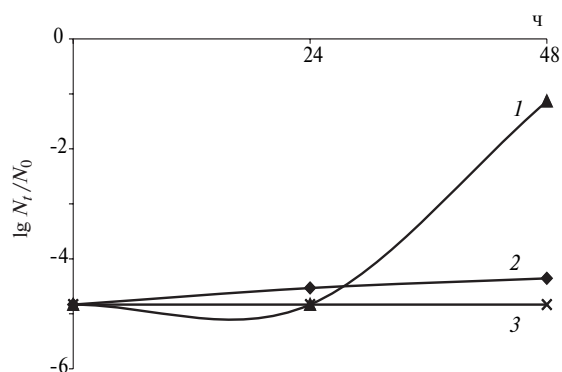


Рис. 2. Кинетика роста культуры *Candida albicans* после контакта с NaOCl при концентрации 5 мг/дм^3 (1—р/р+М-9; 2—р/р+СБ; 3—р/р).

Также изучено влияние температуры на процесс реактивации клеток. Установлено, что максимальная степень реактивации *C. albicans* наблюдается при 27°C , тогда как повышенная (37°C) и пониженная (5°C) температуры не приводят к заметному восстановлению этой культуры (табл. 1).

Таблица 1. Влияние температуры на кинетику роста культуры *Candida albicans* после контакта с NaOCl

Проба	Температура, $^\circ\text{C}$								
	37			26 – 27			5		
	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч	24 ч	48 ч	72 ч
р/р	0	0	0	5	7	0	0	0	0
р/р + М-9	0	0	0	0	19	160	0	0	0
р/р + БС	0	0	0	0	1	7	0	0	0

Известно, что взаимодействие культуры со стресс-фактором влияет на увеличение устойчивости клетки при последующем их контакте за счет преобразований, происходящих в ее белковых структурах [12]. Однако при оценке влияния NaOCl на клетки *C. albicans* в исходной форме, а также в жизнеспособном некультурабельном состоянии было обнаружено незначительное увеличение устойчивости последних.

Поскольку клетки *C. albicans* в ЖНС не растут на общепринятой среде Сабуро, а для их выявления необходимо использовать среду М-9, что делает микологическое определение ЖНС достаточно длительной процедурой, то целесообразно использование прямой микроскопии для их обнаружения.

Проведены предварительные опыты по окраске живых и мертвых (термическая обработка) клеток с использованием красителя трипанового синего (0,5%). Показано, что погибшие клетки в связи с нарушением их мембранной целостности окрашивались в темно-синий цвет (трипанопозитивные), а клетки, сохранившие целостность оболочки (живые), не пропускали краситель и оставались прозрачными (трипанонегативными) (рис. 3). Установлено, что дополнительное внесение в рабочий раствор диметилсульфоксида (ДМСО) позволяет эффективно различать живые и мертвые клетки культуры.

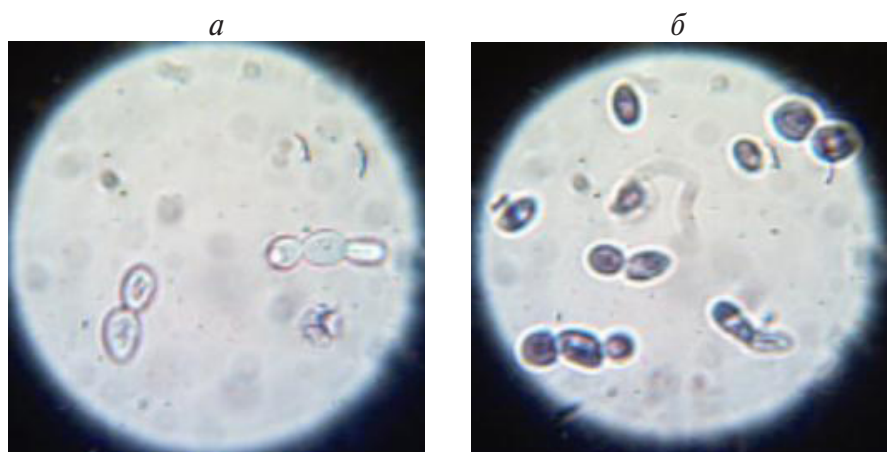


Рис. 3. Клетки *Candida albicans*, окрашенные трипановым синим: а – живые, б – мертвые.

Проведено окрашивание клеток *C. albicans*, пребывающих в жизнеспособном некультурабельном состоянии (рис. 4). Из полученных данных видно, что, несмотря на отсутствие роста колоний культуры

C. albicans на чашке Петри со средой Сабуро, в р/ре находятся как мертвые (окрашенные), так и живые (неокрашенные) клетки культуры. Такие данные свидетельствуют, что клетки после воздействия на них NaOCl переходят в ЖНС. Это согласуется с результатами, полученными при прямом высеве проб на твердую среду Сабуро в экспериментах по реактивации культуры (см. рис. 2). Следует отметить, что клетки *C. albicans* в ЖНС имеют некоторые изменения в их морфологии: они становятся мельче с визуально более тонкими оболочками, овальная форма становится более округлой (см. рис. 4).



Рис. 4. Клетки *Candida albicans* в жизнеспособном некультуральном состоянии, окрашенные трипановым синим.

Выводы. Итак, культура *C. albicans* при воздействии на нее NaOCl (стресс-фактор) способна переходить в жизнеспособное некультуральное состояние и при оптимальных условиях (среда М-9 и температура 27°C) восстанавливаться до нормального культурального состояния. Присутствие клеток *C. albicans* в жизнеспособном некультуральном состоянии подтверждено прямой микроскопией.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости внесения изменений в методику определения качества воды, поступающей к потребителю, что может включать как введение дополнительного этапа культивирования анализируемой пробы воды в среде М9 с последующим ее высевом на твердую питательную среду Сабуро, так и определение клеток *C. albicans* в жизнеспособном некультуральном состоянии в процессе микроскопических исследований. Кроме того, присутствие

в воде микроорганизмов в жизнеспособном некультурабельном состоянии требует разработки новых подходов ее обеззараживания.

Резюме. Досліджено вплив NaOCl на клітини *Candida albicans* з метою виявлення життєздатного некультурабельного стану, і умови їх реабілітації. Проведено мікроскопічні дослідження клітин *Candida albicans* у вказаному стані, пофарбованих трипановим синім.

*M.M. Saprykina,
E.S. Bolgova, V.V. Goncharuk*

FORMATION NONCULTURABLE BUT VIABLE STATE CANDIDA ALBICANS

Summary

The influence of NaOCl on *Candida albicans* cells to detect viable, but nonculturable state and conditions for their rehabilitation has been done. The microscopic examination of viable, but nonculturable state cells of *Candida albicans*, stained with trypan blue has been conducted.

Список использованной литературы

- [1] Hageskal G., Gaustad P., Heier B., Skaar I. // J. Appl. Microbiol. – 2007. – **102**, N 3. – P. 774 – 780.
- [2] A review of fungi in drinking water and the implication for human health. – Department of environment food and rural affairs, 2010. – 170 p.
- [3] Гончарук В.В., Руденко А.В., Савлук О.С., Сапрыкина М.Н. // Вода: гігієна та екологія. – 2013. – **2**, № 1. – С. 34 – 48.
- [4] Rudenko A.V., Savluk O.S., Saprykina M.N., Yastremskaya A.V., Goncharuk V.V. // J. Water Chem. and Technol. – 2011. – **33**, N 5. – P. 323 – 327.
- [5] Savluk O.S., Saprykina M.N., Lupeko V.S., Rudenko A.V., Lavrenchuk I.N., Goncharuk V.V. // Ibid. – 2013. – **35**, № 5. – P. 233 – 237.
- [6] Saprykina M.N., Samsoni-Todorov A.O., Goncharuk V.V. // Ibid. – 2009. – **31**, N 5. – P. 329 – 333.
- [7] Юдин И.П. // Annals of Mechnicov Institute. – 2007. – N 3. – P. 8 – 16.

- [8] *Cuny C., Dukan L., Fraysse L. et. al.* // J. Bacteriol. – 2005. – **187**, N 7. – P. 2244 – 2248.
- [9] *Smith B., Oliver J.D.* // Appl. and Environ. Microbiol. – 2006. – **72**, N 2. – P. 1445 – 1451.
- [10] *Alleron L., Khemiri A., Koubar M. et. al.* // Water Res. – 2013. – **47**. – P. 6606 – 6617.
- [11] *Воронкіна І.А.* // Аналі Мечніков. Ін-ту. – 2006. – № 3. – С. 56 – 60.
- [12] *Saprykina M.M., Savluk O.S., Goncharuk V.V.* // J. Water Chem. and Technol. – 2009. – **31**, № 1. – P. 60 – 65.
- [13] *Методы прижизненного окрашивания.* – Режим доступа: <http://vivakafe.ru/dispersii/50-metody-prizhiznennogo-okrashivaniya.html>
- [14] *Du Z., Nandakumar R., Nickerson K.W., Xu Li* // Water Res. – 2015. – **69**. – P. 110 – 119.

Поступила в редакцию 11.11.2015 г.