
ИНАКТИВАЦИЯ ПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ ЭКСИЛАМПЫ В ПРИСУТСТВИИ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА

С.А. Астахова, Г.Г. Матафонова, В.Б. Батоев

Аналитический центр

Байкальский институт природопользования СО РАН

ул. Сахьяновой, 6, Улан-Удэ, Россия, 670047

В работе установлена высокая эффективность ультрафиолетового излучения KrCl эксилампы (222 нм) для инактивации вегетативных клеток *Bacillus cereus* и *Escherichia coli* O157:H7 в водной среде без и в присутствии пероксида водорода.

В настоящее время вопрос эффективного обеззараживания воды остается актуальным в связи с сохранением риска возникновения и распространения заболеваний, связанных с употреблением питьевой воды, содержащей патогенные бактерии, вирусы и простейшие. Поэтому для обеспечения эпидемиологической безопасности источников питьевого водоснабжения уделяется большое внимание совершенствованию существующих и разработке новых технологий обеззараживания воды [1].

Как известно, на практике распространены три способа обеззараживания воды: реагентная обработка (хлором или его соединениями), ультрафиолетовое облучение и озонирование.

Технологическая простота хлорирования и доступность хлора обусловили его широкое использование в практике водоснабжения. Серьезным недостатком хлорной обработки воды является образование ряда токсичных побочных продуктов — производных хлора (хлорированных фенолов, диоксинов и др.) [2]. Кроме того, хлор (жидкий и газообразный) относится к токсичным веществам, что требует соблюдения повышенной техники безопасности при его транспортировании, хранении и использовании. Озонирование является более дорогим, но экологически безопасным методом обеззараживания воды. Тем не менее, в результате обработки воды озоном также образуются побочные продукты, классифицируемые как токсичные [3]. Обработка ультрафиолетовым излучением (УФ-излучением), как известно, не изменяет химический состав воды. Исследования показали отсутствие побочных негативных эффектов обеззараживания воды даже при дозах, превышавших практически необходимые [4]. Обеззараживающий эффект УФ-излучения обусловлен, главным образом, фотохимическими реакциями, в результате которых происходят необратимые повреждения ДНК, клеточных мембран и органелл, что вызывает, в конечном итоге, гибель клетки [5].

В последнее десятилетие бурное развитие получили новые окислительные технологии, или АОТ (Advanced Oxidation Technologies), на основе так называемых новых (прогрессивных) окислительных процессов, или АОР (Advanced Oxidation Processes). К ним относится обработка воды УФ-излучением в присутствии сильных окислителей (например, озона, пероксида водорода, перхлоратов), в результате которой генерируются высокореакционноспособные гидроксильные радикалы (OH°) и достигается высокий окислительный эффект. В настоящее время АОТ являются одним из наиболее высокоэффективных методов очистки про-

мышленных и хозяйственно-бытовых стоков от токсичных органических загрязнителей [6]. Наиболее безопасным и дешевым окислителем является пероксид водорода. Ранее показано, что при обработке воды УФ-излучением, в присутствии пероксида водорода (УФ/Н₂О₂), образуемые гидроксильные радикалы действуют в 106—109 раз быстрее, чем озон [7]. Бактерицидный эффект же системы УФ/Н₂О₂ относительно малоизучен.

В качестве источников бактерицидного УФ-излучения традиционно используют ртутные лампы низкого, среднего или высокого давления. Практика их применения показала, что оборудование для инактивации (обеззараживания) удорожается, содержание токсичной ртути в оборудовании требует мероприятий по недопущению попадания ртути в питьевую воду и воздух, что удорожает процесс обеззараживания. Поэтому, на наш взгляд, современной альтернативой ртутным лампам являются УФ-эксилампы. Это относительно новый класс источников спонтанного УФ- и вакуумного УФ-излучения, получаемого за счет распада эксимерных (возбужденных димеров инертных газов или галогенов) или эксиплексных молекул (возбужденных комплексов галогенидов инертных газов). Основное их достоинство заключается в том, что до 80% и более общей мощности излучения сосредоточено в относительно узкой полосе (не более 10 нм на полувысоте) соответствующей молекулы [8]. Кроме того, эксилампы отличаются большой энергией фотона (3,5—10 эВ), высокой удельной мощностью излучения и сроком службы (1000—10 000 час.), а также отсутствием ртути, что обеспечивает им преимущество по сравнению с экологически небезопасными ртутными лампами [9—8].

В качестве источника УФ-излучения нами использовалась эксилампа барьерного разряда на молекулах KrCl (222 нм), спектр которой представлен на рис. 1. Бактериальная суспензия облучалась в кювете, расположенной под выходным окном эксилампы. Эффективная освещенность, создаваемая лампой на поверхности облучаемой суспензии, составила 1,95 мВт/см².

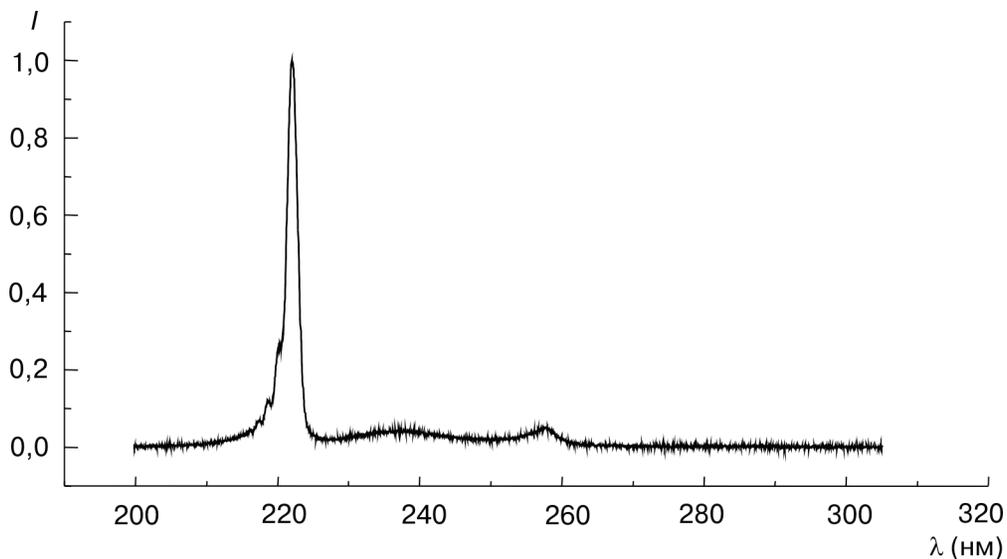


Рис. 1. Спектр излучения эксилампы KrCl (222 нм)

В качестве тест-организмов использовали бактерию *Bacillus cereus* (*B. cereus*), выделенную нами ранее из ила пруда-аэратора Байкальского ЦБК [10] и *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7) из коллекции Нэйпер Университета (г. Эдинбург, Великобритания). *B. cereus* является условным патогенным видом, вызывающим пищевые токсикоинфекции, а также является близкородственным видом возбудителю сибирской язвы *B. anthracis*. *E. coli* O157:H7 — энтеротоксигенный штамм кишечной палочки *E. coli*, возбудитель острых кишечных заболеваний (эшерихиозов), протекающих в виде различной тяжести энтеритов и энтероколитов в сочетании с синдромом общей интоксикации.

Эксперименты проводились по следующей методике. Вегетативные клетки *B. cereus* и *E. coli* O157:H7 для УФ-обработки были приготовлены в стерильной воде из соответствующих суточных культур методом предельных разведений [11]. Полученные бактериальные суспензии, содержащие определенное число клеток, последовательно облучали в кювете с помощью эксилампы в течение 5—300 сек. Исходная численность клеток в облучаемых суспензиях варьировала от 10^2 до 10^7 колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл. При обработке по схеме УФ/ H_2O_2 концентрация пероксида водорода в облучаемой суспензии составляла 0,1%. Для определения эффективности обеззараживания суспензию контрольных (не подвергаемых УФ-обработке) и опытных (подвергаемых УФ-обработке) клеток высевали методом Коха в чашки Петри с агазированной питательным бульоном и инкубировали при 28 °С в течение 24 час. в трех повторностях. Эффект оценивали путем сравнения числа КОЕ, вырастающих из клеток опытного и контрольного вариантов.

Установлено, что энтеротоксигенный штамм кишечной палочки *E. coli* O157:H7 в водной среде является более чувствительным к воздействию УФ-излучения эксилампы, чем клетки *B. cereus*. Как видно из рис. 2а, при исходной численности 10^2 — 10^5 КОЕ/мл полная инактивация *E. coli* O157:H7 достигалась уже после 5—15 сек. облучения, что соответствует дозе 10—30 мДж/см². При высокой исходной численности клеток *E. coli* O157:H7 (10^6 — 10^7 КОЕ/мл), начиная с 15 сек. обработки, скорость инактивации заметно снижалась и наблюдались нелинейные зависимости числа выживших клеток от времени обработки (рис. 2а). Это обусловлено, на наш взгляд, эффектом экранирования, отмеченным ранее при облучении суспензий с высокой численностью клеток [12]. Полагаем, что данный эффект обусловлен рассеянием света на микробных клетках, имеющих размеры, сопоставимые с длиной волны. Тем не менее, доза УФ-излучения 60 мДж/см² (30 сек.) обеспечивала снижение численности на 4,5—4,7 порядка, что соответствует эффективности обеззараживания 99,9%. При увеличении продолжительности УФ-обработки до 120 сек. достигнута полная инактивация при исходной численности 10^6 КОЕ/мл.

В результате комбинированной обработки *E. coli* O157:H7, с участием окислителя пероксида водорода, наблюдалось заметное повышение скорости инактивации. Так, при исходной численности 10^6 и 10^7 КОЕ/мл полная инактивация клеток зафиксирована после 30 сек. (60 мДж/см²) и 120 сек. обработки (240 мДж/см²) (рис. 2а).

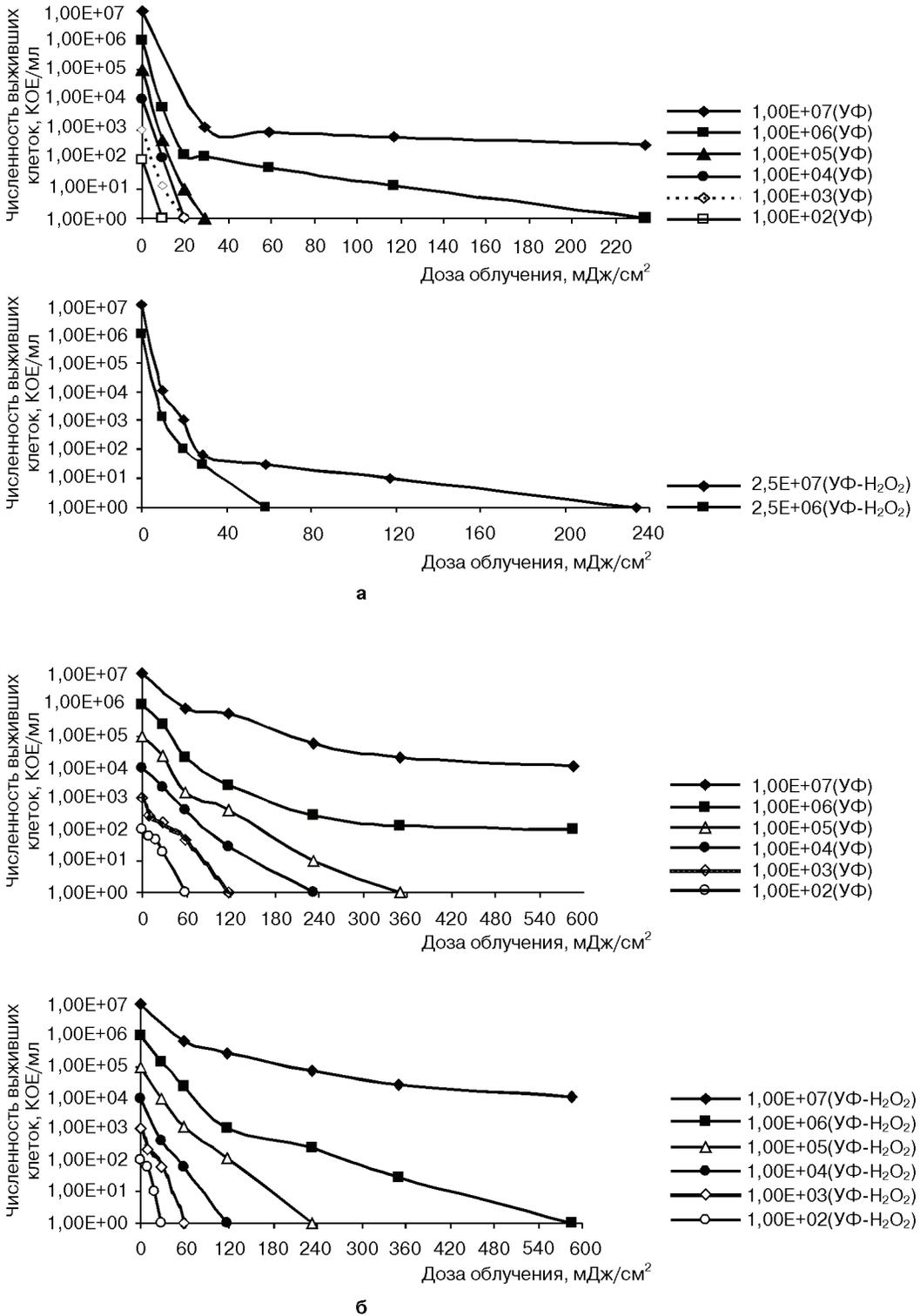


Рис. 2. Изменение численности клеток (а) — *E. coli* O157:H7, (б) — *B. cereus* при различных дозах излучения

Для полного обеззараживания воды, содержащей относительно низкие концентрации клеток *V. cereus* (10^2 — 10^3 КОЕ/мл), достаточной является доза 60—117 мДж/см², достигаемая за 30—60 сек. облучения (рис. 2б). При облучении концентрированной суспензии, содержащей 10^7 КОЕ/мл, эффект комбинированной обработки в присутствии пероксида водорода не обнаружен. Тем не менее, доза облучения 585 мДж/см² (300 сек.) уменьшала исходную численность на 3 порядка. При исходной численности 10^6 КОЕ/мл доля инактивированных клеток 99,9% достигнута за 300 сек. облучения, полная же инактивация наблюдалась за это же время после внесения пероксида водорода.

Нами установлено, что скорости инактивации *V. cereus* (10^2 — 10^4 КОЕ/мл) при обработке по схеме УФ/Н₂О₂ в 2 раза превышали найденные для УФ-облучения без участия пероксида водорода. Образующиеся в результате комбинированной обработки реакционноспособные гидроксильные радикалы инактивируют клетку по двум основным механизмам: (1) окисление и разрушение клеточной стенки и мембраны с последующей дезинтеграцией клетки и (2) их диффузия в клетку, приводящая к инактивации ферментов, повреждению органелл, нарушению синтеза белка и т.д. [13]. Кроме того, пероксид водорода, взаимодействуя с сульфгидридными группами аминокислот белков наружных оболочек, делает микроорганизм более уязвимым к действию других факторов (УФ), поражающих жизненно важные структурные единицы клетки [14]. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности пероксида водорода при инактивации суспензий *V. cereus*, содержащих до 10^6 КОЕ/мл. Несмотря на эффект экранирования, возникающий при облучении высококонцентрированных бактериальных суспензий, инактивация 99,9% клеток обоих видов наблюдалась в течение 2—3 мин обработки.

Высокие концентрации бактерий (10^6 — 10^7 КОЕ/мл), обнаруживаются, главным образом, в неочищенных сточных водах, содержащих также взвешенные частицы, растворенные органические и неорганические соединения. Поэтому, процессы обеззараживания водных сред сложного состава требуют отдельных исследований. При более низкой численности клеток, характерной, например, для микробиологически загрязненной питьевой воды, высокий обеззараживающий эффект с использованием УФ-эксилампы наблюдается уже после 5 сек. облучения.

Полученные результаты позволяют предположить перспективность использования УФ-эксиламп в комбинированных окислительных процессах для эффективного обеззараживания хозяйственно-бытовых стоков и питьевой воды.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ахмадеев В.В., Волков С.В., Костюченко С.В. Применения метода УФ облучения для обеззараживания сточных вод // Вода и экология. — 2000. — № 2. — С. 45—56.
- [2] Луцевич И.Н. Гигиеническая оценка трансформации сложных органических веществ, образующихся в результате обеззараживания питьевой воды хлором // Казанский медицинский журнал. — 2003. — Т. 84. — № 2. — С. 42—145.

- [3] *Апельцина Е.И., Алексеева Л.П., Черская Н.О.* Проблемы озонирования при подготовке питьевой воды // Водоснабжение и сан. техника. — 1992. — № 4. — С. 18—24.
- [4] *Костюченко С.В., Волков С.В., Якименко А.В., Шишов С.Ю., Плятнер В.Н., Стрелков А.Н., Смирнов А.Д.* УФ-излучение для обеззараживания питьевой воды из поверхностных источников // Водоснабжение и сан. техника. — 2000. — № 6. — С. 12—17.
- [5] *Litter M.I.* Introduction to photochemical advanced oxidation processes for water treatment // Handbook of Environmental Chemistry. — 2005. — Vol. 2. — Part M. — P. 325—366.
- [6] *Legrini O.* Photochemical processes for water treatment / O. Legrini, E. Oliveros, A.M. Braun // Chem. Rev. — 1993. — № 93. — P. 671—698.
- [7] *Kruihof J.C.* UV/H₂O₂-treatment: the ultimate solution for pesticide control and disinfection / J.C. Kruihof, P.C. Kamp and M. Belosevic // Water Supply. — 2002. — Vol. 2. — № 1. — P. 113—122.
- [8] *Sosnin E.A.* Applications of capacitive and barrier discharge excilamps in photoscience / E.A. Sosnin, T. Oppenländer, F.V. Tarasenko // Journal of Photochem. Photobiol. — 2006. — № 7. — P. 145—163.
- [9] *Ломаев М.И.* Эксилампы — эффективные источники спонтанного УФ- и ВУФ-излучения / М.И. Ломаев, В.С. Скакун, Э.А. Соснин и др. // Успехи физических наук. — 2003. — Т. 173. — № 2. — С. 201—217.
- [10] *Матафонова Г.Г., Батоев В.Б., Шурапова Г.С., Kohring G.-W., Giffhorn F., Цыренов В.Ж.* *Bacillus cereus* — микроорганизмы-деструкторы 2,4-дихлорфенола // Известия РАН. Серия биологическая. — 2007. — № 5. — С. 534—538.
- [11] *Егоров Н.С.* Руководство к практическим занятиям по микробиологии. — М.: МГУ, 1995.
- [12] *Muranyi P.* Sterilization efficiency of a cascaded dielectric barrier discharge / P. Muranyi, J. Wunderlich, M. Heise // Journal of Appl. Microbiol. — 2007. — № 103. — P. 1535—1544.
- [13] *Matane H.* Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T444, and T7 phage using UV/H₂O₂ Advanced Oxidation / H. Matane, H. Shemer, K. Linnden // Journal of Hazardous Materials. — 2007. — Vol. 146. — № 3. — P. 479—486.
- [14] *Маслюков А.П., Рахманин Ю.А., Матюшин Г.А. и др.* О природе синергизма в процессах обеззараживания воды смесями химических дезинфектантов // Доклады академии наук РАН. — 1992. — Т. 325. — № 6. — С. 1238—1241.

INACTIVATION OF PATHOGENIC MICROFLORA USING ULTRAVIOLET EXCILAMP IN PRESENCE HYDROGEN PEROXIDE

S.A. Astakhova, G.G. Matafonova, V.B. Batoev

Analytic centre
Baikal Institute of Nature Management
Siberian Branch of Russian Academy of Sciences
Sakhyanova str., 6, Ulan-Ude, Russia, 670047

The high inactivation efficiency of ultraviolet radiation of KrCl excilamp (222 nm) was obtained. Vegetative cells of *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7 at initial populations from 10² to 10⁷ CFU ml⁻¹ were treated by KrCl excilamp with and without H₂O₂.