

Л.В. Лаврентьева, С.М. Авдеев,
Э.А. Соснин, К.Ю. Величевская

БАКТЕРИЦИДНОЕ ДЕЙСТВИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ЭКСИМЕРНЫХ И ЭКСИПЛЕКСНЫХ ЛАМП НА ЧИСТЫЕ КУЛЬТУРЫ МИКРООРГАНИЗМОВ

Аннотация. Проведены сравнительные исследования бактерицидного действия излучения нескольких новых эксиламп и ртутной лампы низкого давления на чистые культуры микроорганизмов – стандартные тест-штаммы *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и выделенные из внешней среды. Получен выраженный бактерицидный эффект, причем изученные культуры микроорганизмов обладают различной чувствительностью к излучению эксиламп.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *p. Pseudomonas*, *p. Bacillus*, *p. Sarcina*, инактивация, УФ излучение, эксилампа.

Бурное развитие исследований в области стерилизации, ставшее особенно заметным в последнее десятилетие, вызвано возросшим количеством научных и производственных направлений, требующих создания стерильных условий. Широкое распространение получают различные способы дезинфекции окружающей человека среды.

Среди хорошо известных и широко применяемых методов стерилизации достойное место занимают методы, основанные на использовании ультрафиолетового излучения (УФ излучение), которое как высокоточное оружие поражает именно живые клетки, чаще всего не изменяя химического состава среды (химические дезинфектанты). УФ излучение позволяет осуществлять эффективную стерилизацию, не ухудшая внешнего вида и функциональных характеристик воды, пищи, упаковки, воздуха помещений и т.д., что выгодно отличает его от химических способов дезинфекции.

УФ дезинфекция обладает такими достоинствами, как: 1) высокая эффективность против широкого спектра патогенных микроорганизмов в воде; 2) минимальные пространственные требования к установкам; 3) отсутствие в использовании дополнительных химических веществ (безреагентный процесс); 4) короткое время обработки сред; 5) отсутствие влияния на вкус и запах чистой воды; 6) минимум побочных продуктов, включая токсичные вещества (за редким исключением после обработки не образуются мутагенные фотопродукты); 7) относительная безопасность и легкость введения в эксплуатацию (например, не надо транспортировать и хранить цистерны с хлором); 8) легкость в автоматизации оборудования; 9) возможность внедрения УФ дезинфекции в традиционные системы очистки без их существенного переустройства.

Бактерицидное действие УФ излучения основано на фотохимических реакциях, в результате которых происходят необратимые повреждения ДНК. Помимо ДНК, ультрафиолет действует и на другие структуры клеток, в частности на РНК, клеточные мембраны и т.д. Наиболее эффективным инактиви-

рующим действием обладает коротковолновое ультрафиолетовое излучение с длинами волн 200–295 нм (так называемый бактерицидный диапазон спектра). Излучение в этом диапазоне хорошо поглощается как пуриновыми, так и пиримидиновыми азотистыми основаниями ДНК, которая, как было доказано, является основной мишенью при летальном и мутагенном действии УФ излучения на биосистемы [1]. Отметим, что в рамках бактерицидного диапазона спектра чувствительность к действию УФ излучения вирусов и клеток различного происхождения может сильно различаться.

УФ инаktivация была впервые получена в 1892 г., однако исследование, создание и разработка устройств для её осуществления по-прежнему остаются актуальными [2–5]. Первые ультрафиолетовые лампы были кварцевыми и получили своё название от названия материала колбы.

В целях получения экономичного источника бактерицидного излучения в 1936–1940 гг. были разработаны увиолевые ртутно-аргоновые лампы низкого давления (РЛНД). В них около 90% составляет доля атомарной линии ртути 253,7 нм, обеспечивающей бактерицидное действие. Устройства имеют простые источники питания и неприхотливы в эксплуатации, что обусловило их широкое распространение. Бактерицидная отдача современных РЛНД достигает 16–33% [6. С. 27].

Кроме того, получили распространение мощные ртутные лампы высокого давления (РЛВД), спектр которых представляет собой широкополосный континуум. По разным оценкам, в области длин волн 240–300 нм сосредоточено 11–15% лучистого потока [7], а бактерицидная отдача составляет 8–12% [4, 6].

Общие недостатки этих устройств – вероятность разгерметизации колбы лампы и загрязнение ртутью окружающей среды, что недопустимо в случае медицинских и биологических приложений. Массовое производство ртутных ламп ведёт к большим затратам по их утилизации [8].

В последнее время заметное распространение получают эксимерные и эксиплексные лампы (или эксилампы) [9–13]. Наиболее привлекательными для практических целей являются эксилампы барьерного и емкостного разрядов. Достоинствами этих ламп с практической точки зрения являются:

- 1) отсутствие ртути в колбе, что соответствует экологическим стандартам (исключая эксилампы видимого диапазона спектра на галогенидах ртути HgX^* , которые для дезинфекции не применяются);

- 2) разнообразие в конструктивном исполнении;

- 3) легкость включения с быстрым выходом на максимум мощности после зажигания (питание эксиламп барьерного и емкостного разрядов осуществляется импульсами напряжения с амплитудой до нескольких киловольт и частотой до нескольких сотен килогерц, поэтому данные устройства не нуждаются в специальных стартерах);

- 4) в отличие от люминесцентных и тепловых источников излучения, у эксиламп большая часть лучистого потока сосредоточена в УФ или вакуумном ультрафиолетовом (ВУФ) диапазоне, в сравнительно узкой спектральной зоне полушириной от 2 до 15 нм для эксиплексных молекул и до 30 нм для эксимеров инертных газов.

Эксилампа на димерах Xe_2^* (с максимумом излучения на $\lambda=172$ нм) обеспечивает бактерицидный эффект в контаминированных водных растворах. На первой стадии процесса происходит гомолиз воды ВУФ излучением $\text{H}_2\text{O} + h\nu (\lambda < 190 \text{ нм}) \rightarrow \text{H}_2\text{O}^* \rightarrow \text{H}^\bullet + \bullet\text{OH} + \text{H}^- + e_{\text{aq}}^-$, а на второй – образовавшиеся радикалы $\bullet\text{OH}$ окисляют микробную органику. Эта же эксилампа может быть использована для бактерицидной обработки воздуха, если учесть, что излучение димеров Xe_2^* полностью поглощается воздухом с образованием озона.

В другой стороны, спектр излучения эксиламп на галогенидах инертных газов (например, на молекулах KrCl^* , $\lambda=222$ нм; XeBr^* , $\lambda=283$ нм) практически целиком лежит в бактерицидном диапазоне, что ставит вопрос о возможности их использования в качестве техники УФ дезинфекции. Их излучение поглощается водными и воздушными средами относительно слабо.

Впервые бактерицидное действие излучения ВУФ и УФ эксиламп исследовали Т. Опенлендер и Г. Баум в 1996 г. [14]. Они использовали две эксилампы на молекулах Xe_2^* и KrCl^* . За следующие десять лет доказано бактерицидное действие излучения эксиламп на молекулах XeBr^* (283 нм) XeCl^* (308 нм) [15, 16], а некоторые решения были запатентованы [17–19].

Методические указания по применению ультрафиолетового излучения МУ2.3.975-00 ориентированы на первый максимум поглощения ДНК на длине волны 265 нм [6]. Однако коротковолновое излучение, вплоть до ВУФ диапазона, также может вызывать инактивацию.

На рис. 1 представлены спектр инактивирующего действия УФ излучения на *Escherichia coli* и спектр поглощения ДНК, реконструированные по данным [20, 21], а также максимумы излучения различных ламп. Видно, что спектры почти конгруэнтны. Это означает, что инактивирующее действие излучения на *Escherichia coli* вызвано процессами димеризации оснований ДНК. Поэтому в идеале наибольшим инактивирующим эффектом должен обладать источник излучения, имеющий близкий к поглощению ДНК спектр.

Эксилампы на молекулах XeBr^* , KrCl^* и KrBr^* могут обладать бактерицидным действием, близким к действию излучения ртутных ламп низкого давления (см. рис. 1). Это предположение нуждалось в экспериментальной проверке, поскольку спектры излучения эксиламп не являются линейчатыми и могут захватывать большие интервалы длин волн, обеспечивающих повреждение ДНК.

В частности, бактерицидное действие излучения XeBr -эксилампы обусловлено её спектром, имеющим коротковолновый «хвост» в диапазоне длин волн 260–282 нм, который покрывает половину первого пика поглощения ДНК. Максимум интенсивности В–Х полосы молекулы XeBr^* (283 нм) находится примерно на таком же расстоянии от максимума спектра действия, что и резонансная линия РЛНД, т.е. $\Delta\lambda_1 \approx \Delta\lambda_2$ (рис. 2). Это позволяет надеяться на то, что обе указанные лампы обладают сопоставимым бактерицидным эффектом. Мы провели прямое сравнение бактерицидного эффекта этих ламп.

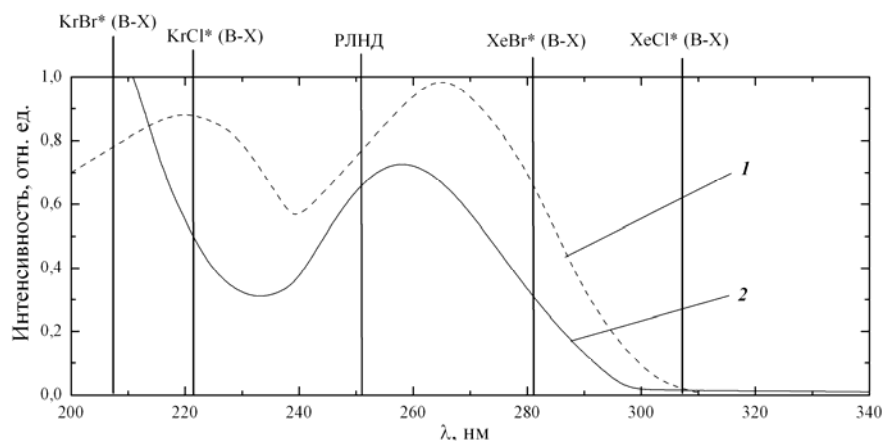


Рис. 1. Спектр инактивирующего действия УФ излучения на *E. coli* (1), интегральный спектр поглощения ДНК (2) (построено по данным [22, 23]) и соответствующие максимумы излучения различных эксиламп и РЛНД

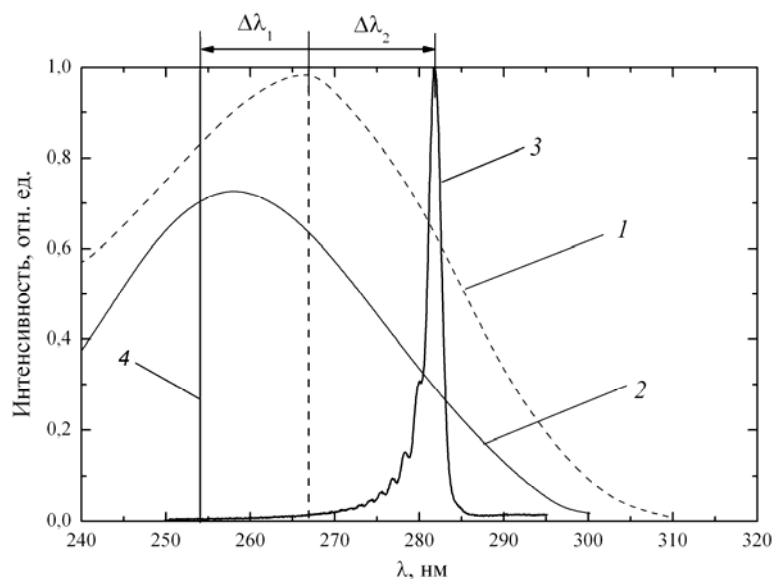


Рис. 2. Спектральные характеристики: 1 – спектр действия УФ излучения на *E. coli*; 2 – интегральный спектр поглощения ДНК; 3 – спектр излучения эксилампы XeBr барьерного разряда; 4 – атомарная линия ртути в РЛНД

В экспериментах использовалась XeBr-эксилампа (модель XeBr_BD_P, лаборатория оптических излучений Института сильноточной электроники СО РАН, Россия) [22], обеспечивающая освещенность до 10 мВт/см^2 , спектр, представленный на рис. 2, и бактерицидная отдача 8,7%. В качестве РЛНД была взята лампа Philips TUV-15 с бактерицидной отдачей 27% [6]. Эта лампа

во время опытов закрывалась диафрагмой таким образом, чтобы обеспечивались дозы облучения, сопоставимые по величине с дозами облучения ХеВг-эксилампой. Так добивались одинаковой освещенности обоих источников излучения. Мощность и дозу облучения определяли в абсолютных единицах фотоприемником С8026 (Hamamatsu Photonics КК) с головкой Н8025-222. В экспериментах учитывали, что ХеВг-эксилампа практически сразу после пуска выходит на режим, а РЛНД требовала 2,5 мин разогрева для стабильного светового потока, поэтому облучение производили только после того, как РЛНД разогреется.

Объектом облучения была тест-культура *Escherichia coli* (штамм ATCC 25922), полученная из музея бактериальных культур ГиСК МИБП им. Л.А. Тарасевича (Москва, Россия). Эта культура проявляет самую низкую среди энтеробактерий чувствительность к разного рода воздействиям, а потому считается важным тест-объектом для оценки санитарно-эпидемиологического состояния окружающей среды.

Эксперименты подтвердили справедливость нашей гипотезы: оба источника излучения действительно обеспечивают одинаковый бактерицидный эффект, потому что излучают в тех участках, где спектры действия излучения сопоставимы по величине (рис. 3).

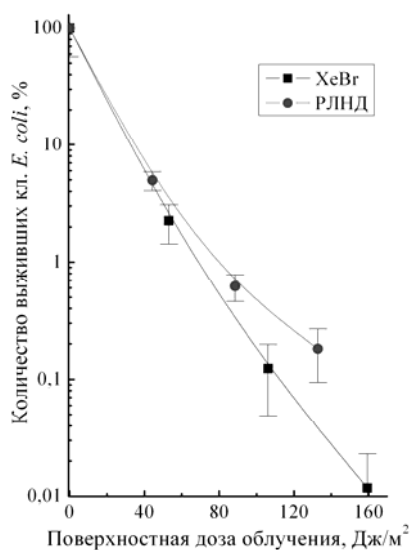


Рис. 3. Зависимость количества выживших клеток *Escherichia coli* от величины поверхностных доз облучения УФ излучением ХеВг-эксилампы (■) и РЛНД (●)

В этом же цикле исследований было дополнительно проведено сравнение бактерицидного действия излучения нескольких эксиламп на молекулах ХеВг* (283 нм), КгСl* (222 нм) и эксилампы с многокомпонентной смесью на рабочих молекулах КгСl* и КгВг* (206 нм) [23].

Облучали различные культуры: эталонные штаммы *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и микроорганизмы, выделенные из воды, кожи и слизистых оболочек человека, идентифицированные нами как представители р. *Sarcina*, р. *Pseudomonas* и р. *Bacillus*.

В таблице приведены значения поверхностной экспозиции в энергетических единицах, обеспечивающие достижение бактерицидной эффективности 99,9% при облучении различными эксилампами. Анализ результатов показывает, что эксилампы обеспечивают указанную бактерицидную эффективность при поверхностных дозах, сопоставимых с дозами РЛНД, если принять во внимание данные [24], и УФ резистентность различных культур микроорганизмов различна [25].

Экспериментальные значения поверхностной дозы облучения клеток микроорганизмов различными эксилампами при бактерицидной эффективности 99,9%

Культура	$H_s, \text{Дж/м}^2$		
	XeBr*	KrCl*	KrCl* + KrBr*
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25923)	60	85	65
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	150	370	320
<i>p. Sarcina</i>	90	–	120
<i>p. Pseudomonas</i>	110	–	160
<i>p. Bacillus</i>	100	190	130

Бактерицидная эффективность эксиламп убывает в следующем ряду: XeBr (282 нм) > KrCl_KrBr (222 и 206 нм) > KrCl(222 нм). Эксилампы KrCl и KrCl_KrBr работают хуже, чем XeBr; возможно, это связано с тем, что коротковолновая часть спектра намного активнее поглощается липидными оболочками микроорганизмов, а это уменьшает вероятность инактивации ДНК. То, что эксилампа KrCl_KrBr работает эффективнее, чем KrCl, можно объяснить наличием излучения В–Х полосы молекулы KrBr* в её спектре. Это излучение поглощается ДНК сильнее, чем излучение на 222 нм (см. рис. 1) и отчасти компенсирует потери излучения в клеточных оболочках.

Следует подчеркнуть, что в сравнении с традиционными РЛНД эксилампы, с точки зрения их применимости для бактерицидной обработки, позволяют шире варьировать геометрию колбы (и, соответственно, дают больше возможностей при создании реакторов для обеззараживания), не содержат ртути (т.е. не требуют выполнения столь жёстких требований по рециклированию, которые характерны для РЛНД), не требуют длительного разогрева, сразу обеспечивают нужный бактерицидный поток.

Кроме того, линейчатый спектр РЛНД не создаёт достаточного количества нарушений в ДНК [26], поэтому инактивированная ДНК способна восстановиться до рабочего состояния после окончания облучения. Этот эффект – фотореактивация ДНК – долгое время не принимался во внимание ни отечественными, ни зарубежными конструкторами бактерицидной техники.

Особенно актуален этот вопрос для систем УФ дезинфекции, предназначенных для обработки воды в замкнутых объемах (бассейны, замкнутые цик-

лы водоподготовки на предприятиях). Реактивировавшие микроорганизмы приобретают дополнительную резистентность к излучению РЛНД на 254 нм. Так, в [26] было показано, что широкополосное излучение КгСl-эксилампы обеспечивает меньшую бактерицидную эффективность, чем РЛНД при равных экспозициях (что совпадает с нашими данными), но и заметно меньшую долю фотореактивированных микроорганизмов. Эффект связан с тем, что широкая полоса УФ излучения обеспечивает большее число необратимых повреждений ДНК, чем линейчатое излучение РЛНД.

Как уже упоминалось, для эксперимента были взяты тест-штаммы микроорганизмов, относящихся к различным систематическим группам и имеющих очень большие различия в строении и физиологии. Сравнивали чувствительность к облучению эксилампами стандартных тест-штаммов и микроорганизмов, выделенных из внешней среды (воды) и с поверхности кожи и слизистых оболочек человека. Это связано с тем, что при наличии выраженного бактерицидного эффекта и в силу некоторых позитивных характеристик (меньшее озонирование воздуха, отсутствие ртути и т.д.) перспективно использование этих ламп в составе установок для физиотерапии заболеваний кожи, слизистых оболочек, послеоперационной обработки швов, ран и т.д. Эти вопросы важно исследовать для оценки ближайших и отдаленных последствий воздействия излучения УФ ламп на микроорганизмы, относящиеся к патогенной и нормальной микрофлоре человека.

Помимо прочих функций (снабжение организма витаминами, органическими и аминокислотами, участие в переваривании ряда питательных веществ), нормальная микрофлора функционирует как важная составная часть всего комплекса защитных механизмов, лежащих в основе резистентности организма. Защитный эффект нормальной микрофлоры заключается в том, что между ее представителями и попадающими из внешней среды микроорганизмами, в том числе патогенными, возникают сложные формы взаимоотношений (от конкуренции до антагонизма). Так, например, только у кишечной палочки известно около 30 видов антибиотикоподобных веществ (колицинов), с помощью которых она активно подавляет своих конкурентов.

Значение защитных свойств нормальной микрофлоры велико, т.к. потенциально опасный агент обезвреживается во внешней среде (на подступах к организму), не допускается его проникновение внутрь. Изменение нормальной микрофлоры – дисбактериоз – наступает в результате применения факторов и веществ, угнетающих нормальную микрофлору или изменяющих условия ее обитания в неблагоприятную сторону [27].

В качестве объекта исследования использовали музейные штаммы *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Эти виды микроорганизмов являются условно-патогенными, относятся к нормальной микрофлоре человека и животных. Наличие их свидетельствует о возможном загрязнении того или иного объекта (почва, вода, воздух, предметы) патогенными бактериями, а количественный учет позволяет определить массивность загрязнения и степень эпидемической опасности объекта. *E. coli* среди энтеробактерий наиболее устойчива к разного рода воздействиям [25] и является основным видом энтеробактерий, применяемым для санитарного контроля дезинфекции с использованием УФ излучения.

Сравнительный анализ чувствительности культур микроорганизмов к бактерицидному действию излучения KrCl_KrBr, KrCl, XeBr-эксиламп показал, что большей устойчивостью обладают стафилококки, псевдомонады и бациллы [28]: они инактивируются большими дозами излучения (см. таблицу). Самой чувствительной к воздействию излучения всех видов использованных в эксперименте эксиламп является *Escherichia coli* (рис. 4–6).

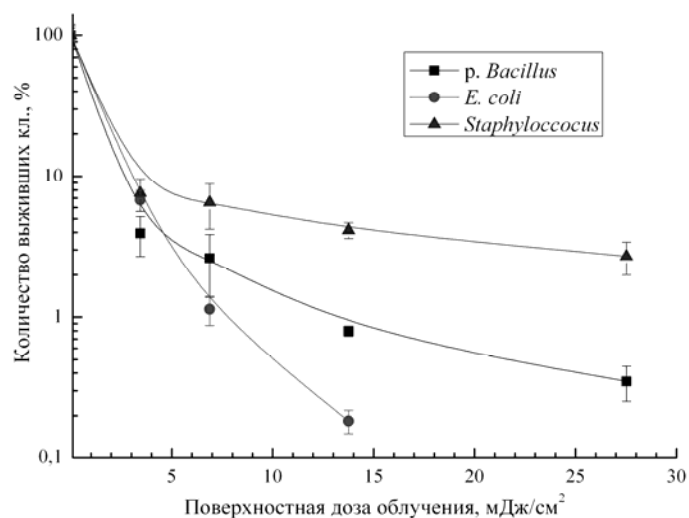


Рис. 4. Зависимость количества выживших клеток микроорганизмов от величины поверхностных доз облучения УФ излучением KrCl_KrBr-эксилампы

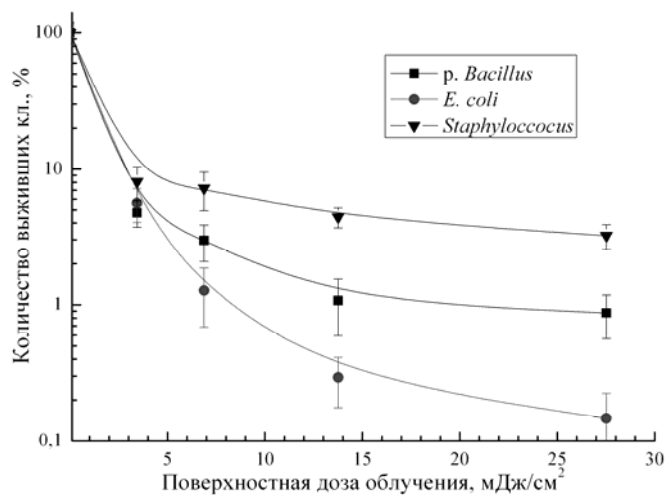


Рис. 5. Зависимость количества выживших клеток микроорганизмов от величины поверхностных доз облучения УФ излучением KrCl-эксилампы

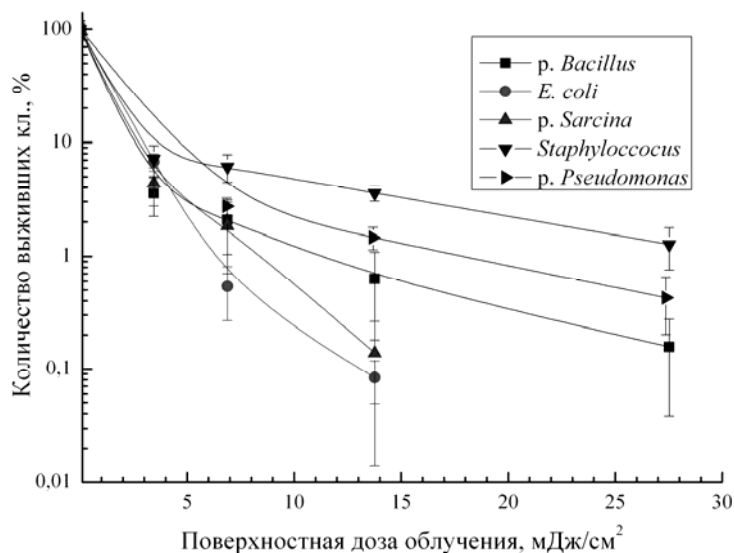


Рис. 6. Зависимость количества выживших клеток микроорганизмов от величины поверхностных доз облучения УФ излучением ХеВг-эксилампы

Результаты исследования влияния действия излучения эксиламп на микроорганизмы и сравнение их с другими светотехническими устройствами, применяемыми для УФ стерилизации, свидетельствуют, что их использование оказывает выраженный бактерицидный эффект на широкий спектр микроорганизмов, обитающих в воде, на поверхности кожи и слизистых оболочек человека. Протестированные штаммы микроорганизмов обладают различной чувствительностью к излучению эксиламп, однако излучение эксиламп не обладает избирательностью действия и губительно действует на все использованные в эксперименте культуры микроорганизмов.

Литература

1. Gates F. A study of the bacterial action of ultraviolet light III / The absorption of ultraviolet by bacteria // Journal of General Physiology. 1930. Vol. 14, № 1. P. 31–42.
2. Вассерман А.Л. Применение ультрафиолетового излучения для обеззараживания воздуха // Светотехника. 2004. № 1. С. 46–47.
3. Шлифер Э.Д. Устройство комбинированной СВЧ УФ озонной бактерицидной обработки жидких, газообразных, и твёрдофазных объектов // Светотехника. 2004. № 6. С. 46–50.
4. Васильев А.И., Красночуб А.В., Кузьменко М.Е. и др. Анализ современных промышленных источников бактерицидного ультрафиолетового излучения // Светотехника. 2004. № 6. С. 42–45.
5. Лаврентьева Л.В., Мастерова Я.В., Соснин Э.А. УФ-инактивация микроорганизмов: сравнительный анализ методов // Вестник Томского государственного университета. Сер. «Биологические науки». Приложение. 2003. № 8. С. 108–113.
6. Методические указания МУ 2.3. 975-00 // Светотехника. 2001. № 1. С. 21–31.

7. Haag W.R. Comparison of commercial lamps for radical oxidation and direct photolysis in water: Report for LLNL. Livermore, CA. 1996. 6 Aug. 18 p.
8. Wolsey R. The Lamp Disposal Controversy // *Lighting Futures*. 1998. Vol. 3, № 2. P. 1–4. (<http://www.lrc.rpi.edu/programs/Futures/LF-LampDisposal/index.asp>).
9. Eliasson B., Kogelschatz U. UV Excimer Radiation from Dielectric-barrier Discharges // *Appl. Phys. B*. 1988. Vol. B 46. P. 299–303.
10. Boyd I.W., Zhang J.-Y., Kogelschatz U. Development and Applications of UV Excimer Lamps / Photo-Excited processes, Diagnostics and Applications. (Ed. A. Peled). The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. P. 161–199.
11. Ломаев М.В., Скаун В.С., Соснин Э.А. и др. Эксилампы – эффективные источники спонтанного УФ и ВУФ излучения // *Успехи физических наук*. 2003. Т. 173, № 2. С. 201–217.
12. Ломаев М.И., Соснин Э.А., Тарасенко В.Ф. и др. Эксилампы барьерного и емкостного разряда и их приложения // *ПТЭ*. 2006. № 5. С. 5–26.
13. Соснин Э.А. Эксилампы и новое семейство газоразрядных ультрафиолетовых облучателей на их основе // *Светотехника*. 2006. № 6. С. 25–31.
14. Oppenländer T., Baum G. Wasseraufbereitung mit Vakuum-UV/UV-Excimer-Durchflusssphotoreaktoren. Wasser-Abwasser. 1996. Vol. 137, № 6. P. 321–325.
15. Coogan J.J. Processing opaque fluids using water-coupled excimer light sources // *Proc. of 10th Int. Symposium on the Science and Technology of Light Sources*. Toulouse, 2004. P. 168, 521.
16. Sosnin E.A., Lavrent'eva L.V., Yusupov M.R. et al. *Proc. of 2nd International Workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields*. Rhodes Greece. London, 2002. P. 953.
17. Патент RU 43458. Приоритет 27.09.2004. Пер. № заявки 2004128561/22 от 27.09.2004. Оpubл. 27.01.2005. Бюл. № 3.
18. Патент RU 2225225 C2. Приоритет 14.08.2001. Пер. № заявки 2001122943/13. Оpubл. 10.03.2004. Бюл. № 7.
19. Патент RU 62224. Приоритет 09.01.2007. Пер. № заявки 2007100293/22 от 09.01.2007. Оpubл. 27.05.2007. Бюл. № 15.
20. Von Sonntag C. *Process technologies for water treatment*. New York: Plenum Press, 1987. P. 128–144.
21. Oppenländer T. *Photochemical Purification of Water and Air*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 2003. 368 p.
22. Портативные коаксиальные эксилампы серии BD_P [Электронный ресурс] // http://www.hcei.tsc.ru/ru/cat/technologies/excilamps/developments/BD_P.pdf
23. Avdeev S.M., Boichenko A.M., Sosnin E.A. et al. Barrier-Discharge Excilamp on a Mixture of Krypton and Molecular Bromine and Chlorine. *Laser Physics*. 2007. Vol. 17, № 9. P. 1119–1123.
24. Руководство З 3.1.683-98 // *Светотехника*. 1998. № 4. С. 4–18.
25. Мудрецова-Висс К.А., Кудряшова А.А., Дедюхина В.П. *Микробиология, санитария и гигиена*. М.: Деловая литература, 2001. 388 с.
26. Clauss M., Mannersmann R., Kolch A. Photoreactivation of *Escherichia coli* and *Yersinia enterocolitica* after irradiation with a 222 nm excimer lamp compared to a 254 nm low-pressure mercury lamp // *Acta hydrochim. Hydrobiol.* 2005. Vol. 33, № 6. P. 579–584.
27. Коротяев А.И., Бабичев С.А. *Медицинская микробиология, иммунология и вирусология*. СПб.: Специальная литература, 1998. 592 с.
28. *Определитель бактерий Берджи* / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига и др. М.: Мир, 1997. Т. 1–2. 800 с.