

И.М. Центер, канд. техн. наук
Байкальский институт природопользования Сибирского отделения
Российской академии наук, Аналитический центр

УДК 577.359, 614.8

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ ПОВЕРХНОСТИ СТЕКЛА ВЫСОКОЧАСТОТНЫМ УЛЬТРАЗВУКОМ

*В работе изучена эффективность обеззараживания поверхности стекла, зараженной клетками *Escherichia coli*, высокочастотным ультразвуком мощностью 30 Вт и частотой 1,7 МГц.*

Ключевые слова: обеззараживание поверхности, высокочастотный ультразвук, инактивация, *Escherichia coli*.

I.M. Tsenter, Cand. Sc. Engineering

DESINFECTATION OF GLASS SURFACE USING HIGH-FREQUENCY ULTRASOUND

*This paper shows the efficiency of glass surface disinfection, contaminated by *Escherichia coli* cells, using high-frequency ultrasound (power 30 Wt, frequency 1,7 MHz).*

Key words: surface disinfection, high-frequency ultrasound, inactivation, *Escherichia coli*.

Введение

Эффективное и регулярное обеззараживание поверхностей предметов, оборудования и помещений различного назначения, в особенности для предприятий пищевой индустрии, медицинских учреждений и лабораторий, является первостепенной задачей для предотвращения микробиологического загрязнения и обеспечения санитарно-эпидемиологической безопасности. В настоящее время используют различные методы обеззараживания поверхностей от патогенной микрофлоры, такие как стерилизация, хлорирование, озонирование, ультрафиолетовое (УФ) облучение. На практике наиболее широко используется реагентная обработка, основанная на прямом контакте поверхностей с водными растворами дезинфектантов или при их распылении по поверхности. К недостаткам применения дезинфицирующих средств, в том числе хлорсодержащих, можно отнести отсутствие долгосрочного эффекта и необходимость значительных временных и трудовых затрат. Кроме того, большинство дезинфектантов имеют, как правило, посторонний запах и токсичные испарения или же достаточно высокую стоимость. Процесс стерилизации применим к определенному типу поверхностей предметов и материалов. Озонирование является эффективным методом обеззараживания поверхностей, но имеет ряд существенных недостатков: дороговизну, непродолжительность воздействия, увеличивает токсичность и окисление воздушной среды, требует тщательного контроля техники безопасности [1]. При обеззараживании поверхностей прямой УФ-обработкой в качестве источников излучения традиционно используются бактерицидные ртутные лампы низкого или высокого давления. Главным недостатком их использования являются относительно большие периоды времени, необходимые для достижения 100%-ного бактерицидного эффекта. Ртутные лампы имеют широкий спектр излучения и низкий коэффициент полезного действия в принятом бактерицидном диапазоне 205–315 нм (10–12%). Кроме того, ртутные лампы содержат металлическую ртуть в свободном состоянии, которая является токсичным загрязнителем. Кроме ртутных ламп также используются импульсные ксеноновые лампы, излучающие в диапазоне 100–1100 нм. На бактерицидный диапазон длин волн 205–315 нм приходится 25–30% всего излучения ксеноновых ламп. Соответственно, бактерицидная эффективность ксеноновых импульсных ламп составит 10–13% суммарного излучения лампы. Кроме того, импульсные источники УФ-излучения характеризуются высокой мгновенной мощностью (до 10 МВт), небольшим сроком службы (около 1000 ч) и гро-

моздким и опасным для персонала высоковольтным источником питания. Эти лампы требуют интенсивного теплоотвода, что делает конструкцию аппаратов на их основе достаточно сложной. Кроме того, после прямого УФ облучения бактерий зачастую наблюдается темновая и световая реактивация клеток. Для интенсификации процессов инактивации патогенной микрофлоры и сокращения времени облучения большой потенциал, на наш взгляд, имеют комбинированные окислительные процессы или АОП («Advanced Oxidation Processes»), где одним из видов воздействия может быть ультразвуковая (УЗ) обработка. Известно, что при этом образуются высокореакционноспособные радикалы, из которых гидроксильный радикал считается наиболее важным агентом, обеспечивающим инактивацию клетки. В связи с этим целью данной работы являлось изучение эффективности ультразвукового воздействия для обеззараживания поверхности стекла с использованием высокочастотного ультразвука.

Экспериментальная часть

В качестве модельного тест-организма взят штамм *Escherichia coli* (*E.coli*) как представитель группы кишечной палочки, к которой относятся энтеротоксигенные штаммы – возбудители острых кишечных заболеваний энтеритов и энтероколитов, в сочетании с синдромом общей интоксикации. Культуру *E.coli* получали при растворении сухого колибактерина *Coli-bacterinum siccum* – микробной массы живых бактерий кишечной палочки М17, лиофилизированных в среде культивирования с добавлением сахарозо-желатозо-желатиновой среды. Для получения вегетативных клеток культуру *E.coli* инкубировали в жидкой питательной среде (мясо-пептонном бульоне) при аэробных условиях в шейкере-инкубаторе BIOSAN ES-20 (180 об/мин, 37° С) в течение 24 ч. Обеззараживание поверхности стекла осуществляли с помощью высокочастотного ультразвука мощностью 30 Вт и частотой 1,7 МГц.

Эксперимент проводился по следующей методике. Вегетативные клетки *E.coli* были приготовлены в стерильной воде из соответствующих односуточных культур методом предельных разведений. На исходную стерильную поверхность стекла наносили 20 мкл бактериальной суспензии, высушивали ее при 37°С в течение 15 мин для получения биопленки с плотностью 10^3 , 10^4 , 10^5 колониеобразующих единиц (к.о.е.) на 1 см^2 . Стекло с биопленкой помещали на металлическую подложку, располагали ее над резервуаром со стерильной водой, которая подвергалась воздействию высокочастотного ультразвука. Для оценки эффективности обеззараживания клетки контрольных (не подвергаемых воздействию высокочастотного ультразвука) и опытных (подвергаемых воздействию высокочастотного ультразвука) образцов асептически смывали со стекла, суспендировали в стерильной дистиллированной воде, высевали на агаризованную питательную среду (мясо-пептонный агар) в трех – пяти повторностях и инкубировали при 37° С в течение 24 ч для подсчета выживших к.о.е. Эффект оценивали путем сравнения числа к.о.е. выживших клеток опытных и контрольных вариантов методом Коха.

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента во время воздействия высокочастотного ультразвука на воду в резервуаре происходило распыление и осаждение мелкодисперсных частиц воды на зараженную поверхность стекла, в результате чего наблюдался эффект обеззараживания.

Установлено, что вегетативные клетки энтеротоксигенного штамма кишечной палочки *E.coli* являются чувствительными к эффектам воздействия высокочастотного ультразвука. Как видно из рисунка, при исходной численности клеток *E.coli* 10^3 к.о.е./ см^2 полная инактивация достигалась после 15 мин обработки, при исходной численности клеток *E.coli* 10^4 к.о.е./ см^2 полная инактивация достигалась после 20 мин обработки и при исходной численности клеток *E.coli* 10^5 к.о.е./ см^2 – после 25 мин обработки. Однако процесс инактивации имел двухфазный характер, и наблюдались линейные зависимости продолжительности первой фазы инактивации от увеличения исходной численности клеток (рис.). Вероятно, эффект плато в начальной стадии инактивации связан с толщиной биопленки, т.е. нижние слои клеток экранируются верхними, и требуется определенное время обработки для их полной инактивации.

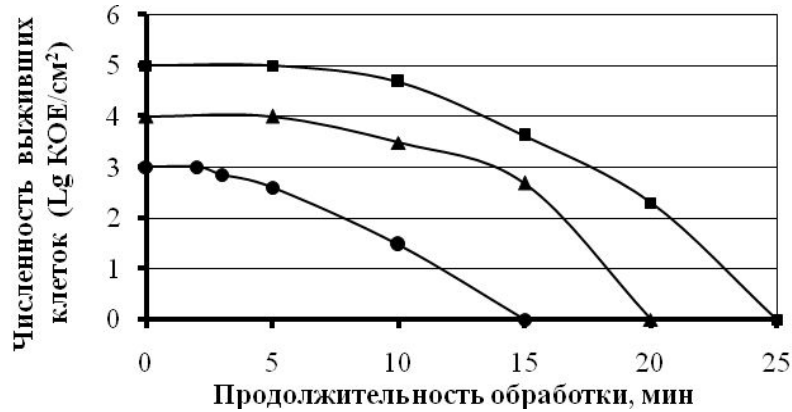


Рис. Изменение численности клеток *E.coli* от продолжительности УЗ-обработки

Известно, что высокочастотные ультразвуковые колебания фокусируются в слое жидкости и вызывают образование на ее поверхности фонтана, из которого происходит распыление мелкодисперсных частиц воды с размерами около 3–5 мкм [2]. При этом под воздействием ультразвуковых волн в воде образуются парогазовые полости (пузырьки) в фазе отрицательного звукового давления акустических колебаний ультразвуковой частоты с последующим их схлопыванием в фазе положительного звукового давления, с образованием импульсов давления и высоких температур [3]. Образование парогазовой полости и эффекты, связанные с ее схлопыванием, зависят от ряда параметров. Это акустические параметры (звуковое давление и частота), термодинамические параметры (внешнее давление и температура) и параметры жидкости (плотность, вязкость, поверхностное натяжение и растворимость газа). При интенсивном акустическом схлопывании кавитационных пузырьков (кратковременная кавитация) во время сжимающей фазы ультразвуковой волны возникают физические, механические и химические эффекты [4, 5, 6]. Физические эффекты затрагивают интенсивность ударной взрывной волны и ее силу, которая продуцирует схлопывание кавитационных пузырьков [6, 7]. Химические эффекты заключаются в генерировании высокореакционноспособных гидроксильных радикалов внутри схлопывающихся пузырьков [5, 6, 8]. Известно, что образующиеся в результате окислительной обработки высокореакционноспособные гидроксильные радикалы инактивируют клетку по двум основным направлениям: 1 – окисление и разрушение клеточной стенки и мембраны с последующей дезинтеграцией клетки и 2 – их диффузия в клетку, приводящая к инаktivации ферментов, повреждению органелл, нарушению синтеза белка и т.п. [9]. Образующиеся при схлопывании пузырьков во время высокочастотной ультразвуковой обработки высокореакционноспособные гидроксильные радикалы повреждают, прежде всего, тонкую клеточную стенку вегетативных клеток грамотрицательной бактерии *E.coli*: атакуют клеточную мембрану, что ведет к лизису клеточной стенки [6], происходит разрыв цитоплазматической мембраны, потеря структурной целостности клеточной стенки и утечка внутриклеточных компонентов – главные причины гибели клеток [5]. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют об эффективности высокочастотного ультразвукового воздействия для обеззараживания поверхности стекла от энтеротоксигенного штамма *E.coli*, содержащей до 10^5 к.о.е./см². Несмотря на эффект экранирования, возникающий на начальной стадии обеззараживания (при обработке высококонцентрированных загрязнений), нами была достигнута 100%-ная инаktivация клеток *E.coli* на поверхности стекла.

Заключение

Предложенный нами способ обеззараживания поверхности стекла свидетельствует о выраженном бактерицидном эффекте высокочастотного ультразвука мощностью 30 Вт частотой 1,7 МГц в отношении энтеротоксигенного штамма *Escherichia coli* при исходной чис-

ленности клеток 10^3 – 10^5 к.о.е./см².

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 12-08-31303 мол_а).

Библиография

1. <http://www.water.ru>
2. Хмельёв В.Н., Шалунов А.В., Генне Д.В. и др. Разработка и исследование новых принципов построения мелкодисперсных ультразвуковых распылителей вязких жидкостей // Известия Томского политехн. ун-та. – 2011. – Т. 319, № 4. – С. 158–163.
3. Бронин Ф.А. Стерилизация изделий ультрафиолетом с ультразвуком. ООО «ТНЦ Техносоник».
4. Joyce E., Phull S.S., Lorimer J.P. et al. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured bacillus us species // Ultrasonics Sonochemistry. – 2003. – N 10. – P. 315–318.
5. Koda S., Miyamoto M., Toma M. et al. Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500 kHz // Ultrasonics Sonochemistry. – 2009. – N 16. – P. 655–659.
6. Wu Xiaoge, Joyce E.M., Mason T.J. Evaluation of the mechanisms of the effect of ultrasound on *Microcystis aeruginosa* at different ultrasonic frequencies // Water Research. – 2012. – N 46. – P. 2851–2858.
7. Cameron M., McMaster L.D., Britiz T.J. Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound // Ultrasonics Sonochemistry. – 2008. – N 15 (6). – P. 960–964.
8. Mason T.J., Cobley A.J., Graves J.E. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound // Ultrasonics Sonochemistry. – 2011. – N 18. – P. 226–230.
9. Mamane H., Shemer H., Linden K.G. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H₂O₂ advanced oxidation // Journal of Hazardous Materials. – 2007. – N 146. – P. 479–486.

Bibliography

1. <http://www.water.ru>
2. Khmelyov V.N., Shalunov A.V., Genne D.V. et al. Development and research of new principles of fine ultrasonic nebulizers of viscous liquids. // Proceedings of the Tomsk Polytechnic University. – 2011. – Vol. 319, N 4. – P. 158–163.
3. Bronin F.A. Sterilization of products by ultraviolet radiation with ultrasound. LLC «Technosonic».
4. Joyce E., Phull S.S., Lorimer J.P. et al. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured bacillus us species // Ultrasonics Sonochemistry. – 2003. – N 10. – P. 315–318.
5. Koda S., Miyamoto M., Toma M. et al. Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500 kHz // Ultrasonics Sonochemistry. – 2009. – N 16. – P. 655–659.
6. Wu Xiaoge, Joyce E.M., Mason T.J. Evaluation of the mechanisms of the effect of ultrasound on *Microcystis aeruginosa* at different ultrasonic frequencies // Water Research. – 2012. – N 46. – P. 2851–2858.
7. Cameron M., McMaster L.D., Britiz T.J. Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound. // Ultrasonics Sonochemistry. – 2008. – N 15 (6). – P. 960–964.
8. Mason T.J., Cobley A.J., Graves J.E. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound // Ultrasonics Sonochemistry. – 2011. – N 18. – P. 226–230.
9. Mamane H., Shemer H., Linden K.G. Inactivation of *E. coli*, *B. subtilis* spores, and MS2, T4, and T7 phage using UV/H₂O₂ advanced oxidation // Journal of Hazardous Materials. – 2007. – N 146. – P. 479–486.