

DOI:10.19853/j.zgjsps.1000-4602.2022.11.008

UV-LED/氯工艺灭活枯草芽孢杆菌机理研究

冉治霖^{1,2,3}, 毛竹^{3,4}, 相会强^{1,2}, 李绍峰³, 聂锦旭⁴, 王志红⁴

(1. 深圳信息职业技术学院 创新教育研究院, 广东 深圳 518172; 2. 深圳信息职业技术学院 交通与环境学院, 广东 深圳 518172; 3. 深圳职业技术学院 深圳市工业节水及城市污水资源化技术重点实验室, 广东 深圳 518055; 4. 广东工业大学 土木与交通工程学院, 广东 广州 510006)

摘要: 采用紫外发光二极管(UV-LED)联合次氯酸钠灭活枯草芽孢杆菌,并分析了单独UV-LED和单独氯的灭活效果。结果发现,UV-LED/氯体系存在着协同作用,灭活效果远好于单独UV-LED和单独氯。蛋白质溶出、暗修复和细胞表面结构情况分析表明,产生的自由基破坏了细胞外部结构,致使次氯酸分子和次氯酸根离子进入细胞内,同时被破坏的细胞更易于UV穿透,二者共同作用造成了DNA受损,最终导致其失活。此外,评估了UV-LED、羟基自由基、氯、氯自由基和次氯基在UV-LED/氯灭活过程中的贡献,发现UV-LED和羟基自由基贡献较大。

关键词: 紫外发光二极管; 氯; 枯草芽孢杆菌; 灭活机理

中图分类号: TU992 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4602(2022)11-0043-06

Mechanism of *Bacillus subtilis* Inactivated by Ultraviolet Light-emitting Diode and Chlorine

RAN Zhi-lin^{1,2,3}, MAO Zhu^{3,4}, XIANG Hui-qiang^{1,2}, LI Shao-feng³, NIE Jin-xu⁴,
WANG Zhi-hong⁴

(1. Institute of Innovational Education Research, Shenzhen Institute of Information Technology, Shenzhen 518172, China; 2. School of Traffic and Environment, Shenzhen Institute of Information Technology, Shenzhen 518172, China; 3. Shenzhen Key Laboratory of Industrial Water Saving and Municipal Sewage Reclamation Technology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China; 4. School of Civil and Transportation Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: *Bacillus subtilis* was inactivated by ultraviolet light-emitting diode (UV-LED) combined with sodium hypochlorite, and the inactivation performance of UV-LED and chlorine alone was analyzed. Synergistic effect existed in the UV-LED/chlorine system, and the inactivation performance was much better than that of UV-LED and chlorine alone. Protein dissolution, dark repair and cell surface structure showed that the produced free radicals damaged the outer structure of the cell, leading to the entry of hypochlorous acid molecules and hypochlorite ions into the cells, while the damaged cells were more

基金项目: 广东省高等教育“创新强校工程”项目(2017GKTSCX065); 深圳市科技计划项目(GJHZ20180416164721073); 深圳信息职业技术学院校级科研平台项目(PT2017E003); 深圳信息职业技术学院科技项目(SZIT2019KJ006)
通信作者: 李绍峰 E-mail: lshaofeng@szpt.edu.cn

susceptible to UV penetration. The combination of the two actions caused DNA damage and ultimately inactivated the bacteria. In addition, the contributions of UV-LED, hydroxyl radical, chlorine, chlorine radical and hypochlorous acid to UV-LED/chlorine inactivation were evaluated, and it was found that the contribution of UV-LED and hydroxyl radical was larger.

Key words: ultraviolet light-emitting diode; chlorine; *Bacillus subtilis*; inactivation mechanism

水中致病性微生物对环境安全危害极大,并且具有极强的感染性,可通过多种途径感染人和动物,从而引发各种疾病,严重的甚至导致死亡^[1]。以隐孢子虫为代表的致病性微生物可通过食物和水进入人畜体内,引起痉挛、反胃及腹泻等不良症状,是儿童、老人和免疫缺陷者的重要致病原^[2]。研究发现,枯草芽孢杆菌具有与隐孢子虫相似的生物特性^[3],而且没有致病性,同时又易于计数,因此常用其作为“两虫”的替代物进行相关研究^[4]。此外,枯草芽孢杆菌常作为水厂深度处理效果的指示性微生物和消毒效果的评价指标^[5],因此其具有重要的研究价值。

紫外(UV)技术具有能有效灭活原生动物寄生虫、不存在消毒剂残留、消毒副产物形成可忽略不计,以及易于改造现有水处理工艺等优势^[6],已成为欧美国家饮用水和废水处理中主流消毒工艺。传统紫外汞灯具有驱动电压高、能耗大、寿命相对较短、含汞毒性等缺点^[7]。2013年1月19日,联合国环境规划署通过了《水俣公约》,要求缔约国自2020年起禁止生产及进出口含汞产品。因此,寻找传统紫外汞灯的替代品尤为重要。紫外发光二极管(UV-LED)有着明显的优势,如:耐用、尺寸设计灵活、可定制发射光谱、不含有毒物质、瞬间预热、电源要求简单、使用寿命长等^[8-10]。但UV-LED光电转化率极低($\leq 5\%$),消毒效果不理想。而常用的氯消毒剂对水中某些致病微生物(如隐孢子虫)的灭活效果较差,同时会产生有毒的消毒副产物。因此,将UV-LED和氯两种消毒技术组合使用,实现优势互补,逐渐成为研究热点。

Zhang等^[11]的研究表明,UV/氯可以有效灭活具有多种抗生素抗性的细菌,同时能去除抗生素抗性基因。Wang等^[12]的研究表明,UV/氯能有效降解卡马西平。UV/氯体系的原理是氯受到UV照射后,发生一系列由活性氯引发的链式反应^[13]。反应产生

的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、氯自由基($\text{Cl}\cdot$)和次氯基($\text{OCl}\cdot$)均有强氧化性,可以灭活致病性微生物或降解有机物。同时,相比于其他UV体系(如UV/ H_2O_2 和UV/过硫酸盐),UV/氯在水处理方面有着极大的潜力,例如:经济效益高、处理效率高、反应时间短、 HClO 具有更强的紫外吸收率、工艺升级简单等^[14-15]。但目前对基于UV-LED的UV/氯体系的研究主要集中在如何降解水中药物及个人护理品等有机物,而用于灭活微生物的研究较少,且基本从水质条件和投加量顺序等方面进行研究,很少涉及灭活机制。

笔者探讨了UV-LED/氯、单独UV-LED和单独氯等3种方式对枯草芽孢杆菌灭活效果的差异,利用扫描电子显微镜(SEM)观察枯草芽孢杆菌灭活前后的细胞形态。同时,检测灭活以后溶液中蛋白质含量、环丁烷嘧啶二聚体(CPD)浓度,分析枯草芽孢杆菌暗修复的效果,通过投加自由基抑制剂[硝基苯(NB)、叔丁醇(TBA)和 HCO_3^-]研究自由基灭活动力学常数以及贡献率,从而探讨UV-LED/氯工艺灭活枯草芽孢杆菌的机理。

1 材料与方法

1.1 试验材料

枯草芽孢杆菌(ATCC6633)购于标准物质网。向50 mL灭菌烧杯中加入30 mL离心后与无菌磷酸缓冲溶液(PBS)混合的枯草芽孢杆菌菌液,保持其数量为 10^6 CFU/mL,调节pH为 7.0 ± 0.2 ,温度为 $(25\pm 1)^\circ\text{C}$,氯投加量为8 mg/L,反应一定时间后采用平板菌落计数法检测枯草芽孢杆菌数量。

本试验采用的UV-LED由深圳市蓝巨科技有限公司提供。虽然理论上254 nm波长的消毒效果最佳,但275 nm波长在单位光功率成本和水对UV的吸收衰减方面具有明显优势,因此本试验中UV-LED的波长选用275 nm,发光角度为 120° ,共两颗灯珠,单颗功率为1.7 mW,辐照强度为 $0.2\text{ mW}/\text{cm}^2$ 。

采用石英玻璃封住底部,装置密封,将UV-LED覆盖于50 mL烧杯上,灯珠正好浸入菌液表面,可视为垂直照射,烧杯外壁用锡箔纸包裹遮光。试验装置如图1所示。

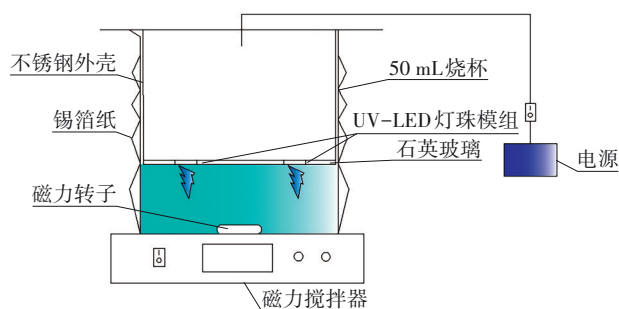


图1 UV-LED装置示意

Fig.1 Schematic diagram of UV-LED device

氯消毒溶液现用现配,以分析纯等级的次氯酸钠溶液(6%~14%)作为消毒剂制备原液。采用无菌磷酸缓冲溶液(PBS)稀释至一定浓度,通过DPD法测定消毒液中的氯浓度。

1.2 试验方法

将一定浓度的氯消毒剂和枯草芽孢杆菌菌悬液加入无菌PBS溶液中,配制成30 mL的反应液,倒入50 mL灭菌烧杯中,并在烧杯外包裹一层锡箔纸,用磁力搅拌器进行搅拌。UV-LED/氯试验组中,先加入一定浓度氯溶液搅拌30 s,再进行UV-LED照射。反应至预先设定的时间后,用10%无菌硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)终止反应,取样并对样品进行平板计数。

1.3 检测项目及方法

蛋白质浓度检测:取灭活一段时间后的枯草芽孢杆菌菌悬液,在4℃、10 000 r/min的转速下离心15 min,取0.1 μL上清液,采用紫外-可见分光光度计在波长260、280 nm处测定吸光度(A)。蛋白质浓度(mg/mL)按式(1)计算。

$$\text{蛋白质浓度} = 1.45A_{280} - 0.74A_{260} \quad (1)$$

暗修复效果:将经过氯、UV-LED和UV-LED/氯灭活8.33 min后的枯草芽孢杆菌用锡箔纸遮光,置于37℃的恒温箱中,分别检测遮光培养12、24和48 h后的样品浓度。复活率按式(2)计算。

$$\text{复活率} = \frac{N_t - N}{N_0 - N} \times 100\% \quad (2)$$

式中: N_0 为紫外照射前水样中的枯草芽孢杆菌

数量,CFU/mL; N 为紫外照射后水样中的枯草芽孢杆菌数量,CFU/mL; N_t 为暗修复一段时间后水样中的枯草芽孢杆菌数量,CFU/mL。

环丁烷嘧啶二聚体(CPD)检测:试验完成以后取样,首先对灭活后的枯草芽孢杆菌进行DNA提取和ELISA包被处理,然后采用酶标仪测定492 nm处的OD值。

扫描电子显微镜(SEM)检测:取样品悬液,在4℃、10 000 r/min转速下离心15 min,弃去上清液,沿管壁缓慢加入500 μL戊二醛(2%),4℃静置固定过夜后再次离心。依次使用PBS和不同浓度酒精(50%~100%)进行漂洗,将醋酸异戊酯与100%乙醇按1:1的比例混合,用来置换脱水后的样品。然后加入乙酸异戊酯,自然干燥后待用。最后将杆菌切开,粘在导电胶上,喷金后使用SEM进行观察。

UV辐射剂量:UV辐射剂量为UV强度和辐射时间的乘积,其中UV辐射强度由辐射强度测量计检测。UV辐射剂量按式(3)计算。

$$D = I \times t \quad (3)$$

式中: D 为UV辐射剂量, mJ/cm^2 ; I 为UV辐射强度, mW/cm^2 ; t 为辐射时间,s。

消毒效果评价:消毒效果根据微生物的灭活率来评价,灭活率按式(4)计算。

$$\text{灭活率} = \lg(N_0/N) \quad (4)$$

动力学参数计算:Chick-Watson模型是关于消毒剂浓度变化的经验模型。本研究中,紫外辐射剂量随时间发生变化,且灭活过程中不存在“延滞”现象,故选用Chick-Watson模型,采用一级动力学反应来表达微生物的灭活速率,见式(5)。

$$\ln(N_0/N) = kC^n t \quad (5)$$

式中: k 为反应速率常数, s^{-1} ; C 为消毒剂浓度; n 为任意时刻菌液浓度指数。

UV-LED/氯体系降解动力学可由式(6)表述。

$$k(\text{UV}/\text{氯}) = k(\text{UV}) + k(\text{氯}) + k(\cdot\text{OH}) + k(\text{Cl}\cdot) + k(\text{OCl}\cdot) \quad (6)$$

通过考察添加自由基抑制剂对灭活速率常数 k 的影响来判断自由基氧化在UV-LED/氯灭活中的贡献,见式(7)。

$$p = [(k_0 - k_i)/k_0] \times 100\% \quad (7)$$

式中: k_0 、 k_i 分别为未添加抑制剂和抑制自由基后的准一级动力学常数。

2 结果与讨论

2.1 灭活效果对比

单独UV-LED、单独氯和UV-LED/氯3种消毒方式灭活枯草芽孢杆菌的效果如图2所示。可以看出,增加紫外辐射剂量和延长灭活时间均可以提高对枯草芽孢杆菌的灭活效果。当紫外辐射剂量达到 100 mJ/cm^2 (8.33 min)时,UV-LED/氯组对枯草芽孢杆菌的灭活率为5.9,而UV-LED组的灭活率为3.82。相同灭活时间(8.33 min)时,单独氯组的灭活率仅为0.33。

分析原因,UV-LED/氯体系存在着其他两个单独系统无法发生的化学反应,并且能够产生强氧化性自由基。自由基虽然无法直接灭活枯草芽孢杆菌,但其有助于破坏细胞结构,使得具有强氧化性的次氯酸分子和次氯酸根离子进入细胞内,同时也会使紫外线更容易穿透细胞,二者共同作用造成DNA等重要遗传物质受损,最终使灭活效果显著提升。Koivunen等^[16]指出,基于UV-LED的UV/氯体系不仅是两个单独灭活体系的加成,而是存在着协同作用。

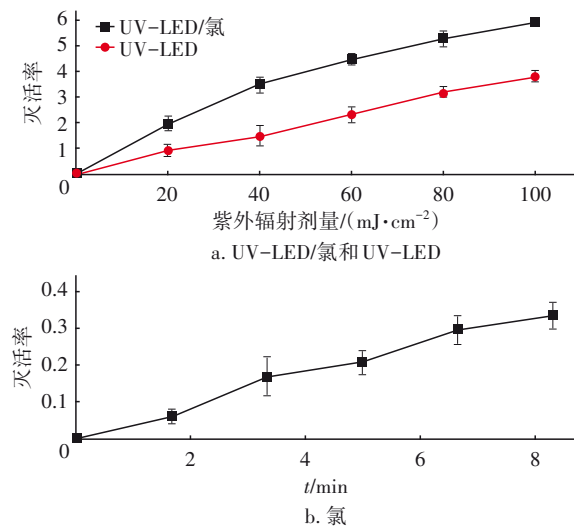


图2 不同消毒方式对枯草芽孢杆菌的灭活率

Fig.2 Inactivation rate of *Bacillus subtilis* by different disinfection methods

2.2 灭活机理研究

2.2.1 灭活过程中蛋白质的变化

溶液中蛋白质的浓度可用于评价灭活后细胞的破损程度。采用UV-LED、氯和UV-LED/氯3种消毒工艺灭活8.33 min后,UV-LED/氯体系溶液中的蛋白质浓度为 0.524 mg/mL ,远远高于UV-LED

(0.047 mg/mL)和氯(0.028 mg/mL)。由此推断,UV-LED/氯体系对枯草芽孢杆菌细胞外部结构的破坏作用最强,单独UV-LED次之,单独氯的效果最差。可见,紫外线和氯各自单独作用并不能对细胞结构造成较大损伤,所以这两组溶液中蛋白质浓度差异不大。而UV-LED/氯体系中不仅有UV和氯的存在,还有强氧化性自由基,使细胞结构受到破坏。

2.2.2 环丁烷嘧啶二聚体检测效果

UV辐射直接作用于微生物的DNA,因而具有很好的杀菌效应。经紫外照射后,DNA分子上两个相邻的胸腺嘧啶(T)或胞嘧啶(C)之间能够以共价键的形式连接成环丁酰环,这种环式结构称为环丁烷嘧啶二聚体(CPD),环丁烷嘧啶二聚体的形成被认为是导致细胞失活的主要原因。采用UV和UV-LED/氯两种体系灭活枯草芽孢杆菌,4.17 min时CPD在492 nm处的吸光度分别为0.21和0.22;8.33 min时的吸光度分别为0.29和0.30。随辐射剂量的增加,UV和UV-LED/氯体系中产生的CPD分别提高38.10%和36.36%,说明CPD的形成主要是由于紫外线照射导致的,与紫外辐射剂量相关。同时,UV-LED/氯体系产生的自由基破坏细胞外部结构后,有助于紫外线穿透细胞,因此产生的CPD高于单独UV-LED。

2.2.3 扫描电镜表征结果

图3为不同消毒方式下扫描电镜照片。

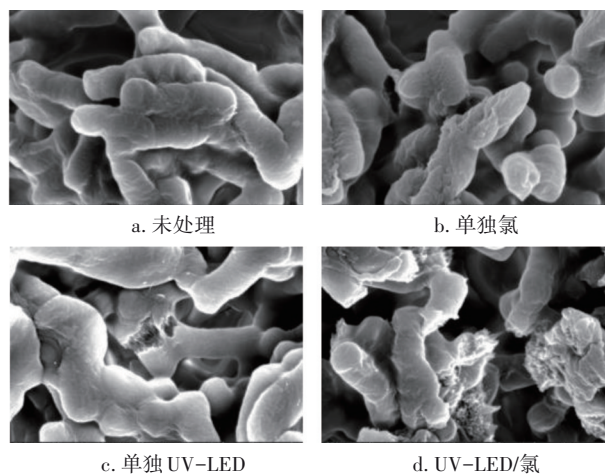


图3 不同消毒方式下扫描电镜照片

Fig.3 SEM images of different disinfection methods

由图3可知,未经处理的枯草芽孢杆菌具有完整光滑的杆状结构;经单独氯灭活8.33 min后,枯

草芽孢杆菌的表面结构有明显褶皱;经过单独 UV-LED 灭活相同时间后,枯草芽孢杆菌表面结构出现破损;经 UV-LED/氯灭活相同时间后,枯草芽孢杆菌表面结构已经断裂,并且破损严重。上述现象表明,单独氯和单独 UV-LED 都可以对细胞外部结构造成一定程度的损伤,但相同时间内 UV-LED/氯体系产生的自由基使得细胞外部结构遭受的破坏更严重,可见该组合体系对枯草芽孢杆菌的灭活效果更彻底。

2.3 暗修复效果分析

紫外线照射以后,有些微生物可以通过光活化和暗修复等机制修复受损细胞,从而重新激活微生物,这会大大降低灭活效果。但是枯草芽孢杆菌并不存在光复活酶,所以本研究分析其暗修复的效果。枯草芽孢杆菌经单独 UV-LED 灭活以后,在 12、24 和 48 h 时的复活率分别为 0.186%、2.1%、4.1%,相较于相同时间内经 UV-LED/氯灭活后的复活率 0.000 35%、0.000 725% 和 0.000 975% 要高 3~4 个数量级。其差异巨大的原因主要是 UV-LED/氯体系产生的自由基破坏细胞外部结构后,导致酶和 DNA 严重损伤,使其暗修复机能受到无法挽回的毁伤。

2.4 灭活贡献率分析

叔丁醇(TBA)可以有效淬灭所有自由基,硝基苯(NB)能够淬灭·OH,而硝基苯(NB)加碳酸氢根离子可以用于去除·OH 和 Cl·。为研究 UV-LED/氯灭活枯草芽孢杆菌过程中,自由基、氯和 UV-LED 对灭活的贡献率,在前期预试验的基础上,向反应体系中分别加入 5 mmol/L 的 TBA、100 mmol/L 的 NB 和 100 mmol/L 的 NB 与 5 mmol/L 的 HCO₃⁻用于淬灭相应自由基。图 4 为不同消毒方式下的准一级灭活动力学曲线。表 1 为各作用因素的一级动力学常数及相关系数。

经计算,UV-LED、·OH、氯、Cl·和 OCl·的灭活贡献率分别为 65.8%、21.5%、5.1%、4.4% 和 3.2%,且相关系数都大于 0.98。可见,在 UV-LED/氯灭活枯草芽孢杆菌体系中,UV-LED 和·OH 对枯草芽孢杆菌的灭活起主要作用,而氯、Cl·和 OCl·的影响较小。究其原因,·OH 相较于 Cl·等具有更高的氧化电位,能够破坏细胞外部结构,并有助于紫外线穿过细胞形成更多的嘧啶二聚体,阻碍 DNA 复制。

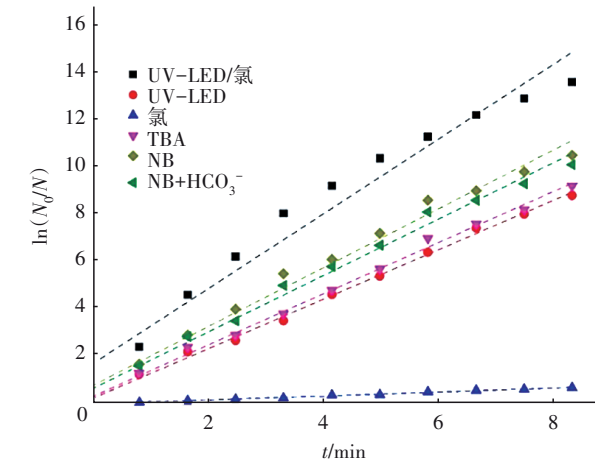


图 4 不同消毒方式下的准一级灭活动力学曲线

Fig.4 Quasi-first order inactivation kinetic curves under different disinfection methods

表 1 各作用因素的一级动力学常数及相关系数

Tab.1 First-order kinetic constants and correlation coefficients under different factors

项目	k/min^{-1}	相关系数 R^2
UV-LED	1.04	0.996 4
氯	0.08	0.993 5
·OH	0.34	0.982 8
Cl·	0.07	0.987 6
OCl·	0.05	0.994 7

3 结论

① 相同反应时间下,UV-LED/氯对枯草芽孢杆菌的灭活率高于单独 UV-LED,远远高于单独氯,该体系内存在协同作用。无论从形态结构还是从细胞内部核酸而言,与单独 UV-LED 和单独氯相比,UV-LED/氯对枯草芽孢杆菌都最具破坏性。

② UV-LED/氯体系通过自由基破坏了枯草芽孢杆菌的外部结构,损害细胞膜蛋白,影响细胞膜的流动性和通透性,造成次氯酸分子等具有强氧化性的物质进入细胞内,也使得 UV 更容易穿透细胞,二者共同作用破坏了细胞内部蛋白质及重要遗传物质,导致转录复制受到干扰,最终使枯草芽孢杆菌失去活性。

③ 在 UV-LED/氯体系灭活枯草芽孢杆菌过程中,UV-LED、·OH 对枯草芽孢杆菌的灭活起主要作用,而氯、Cl·和 OCl·的贡献较小。

参考文献:

[1] LISLE J T, ROSE J B. *Cryptosporidium* contamination of

- water in the USA and UK: a mini-review[J]. *Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA*, 1995, 44(3): 103-117.
- [2] 杨兴友, 王光西. 人体隐孢子虫病流行状况[J]. *寄生虫病与感染性疾病*, 2005, 3(3): 135-137.
- YANG Xingyou, WANG Guangxi. Review on epidemic situation of human cryptosporidiosis[J]. *Parasites and Infectious Disease*, 2005, 3(3): 135-137(in Chinese).
- [3] SETLOW B, MCGINNIS K A, RAGKOUSI K, *et al.* Effects of major spor-specific DNA binding proteins on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties[J]. *Bacteriology*, 2000, 182(24): 6906-6912.
- [4] CHO M, KIM J H, YONG J. Investigating synergism during sequential inactivation of *Bacillus subtilis* spores with several disinfectants[J]. *Water Research*, 2006, 40(15): 2911-2920.
- [5] HUERTAS A, BARBEAU B, DESJARDINS C, *et al.* Evaluation of *Bacillus subtilis* and coliphage MS2 as indicators of advanced water treatment efficiency[J]. *Water Science and Technology*, 2003, 47(3): 255-259.
- [6] CHOI Y, CHOI Y J. The effects of UV disinfection on drinking water quality in distribution systems[J]. *Water Research*, 2010, 44(1): 115-122.
- [7] CHEN J, LOEB S, KIM J. LED revolution: fundamentals and prospects for UV disinfection applications[J]. *Environmental Science: Water Research and Technology*, 2017, 3(2): 188-202.
- [8] SONG K, MOHSENJ M, TAGHIPOUR F. Application of ultraviolet light-emitting diodes (UV-LEDs) for water disinfection: a review[J]. *Water Research*, 2016, 94: 341-349.
- [9] MATAFONOVA G, BATOEV V. Recent advances in application of UV light-emitting diodes for degrading organic pollutants in water through advanced oxidation processes: a review[J]. *Water Research*, 2018, 132: 177-189.
- [10] KNEISSL M, SEONG T Y, HAN J, *et al.* The emergence and prospects of deep-ultraviolet light-emitting diode technologies[J]. *Nature Photonics*, 2019, 13(4): 233-244.
- [11] ZHANG T Y, HU Y R, JIANG L, *et al.* Removal of antibiotic resistance genes and control of horizontal transfer risk by UV, chlorination and UV/chlorination treatments of drinking water[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 358: 589-597.
- [12] WANG W L, WU Q Y, LI Z M, *et al.* Light-emitting diodes as an emerging UV source for UV/chlorine oxidation: carbamazepine degradation and toxicity changes[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2016, 310: 148-156.
- [13] CHAN P Y, EL-DIN M G, BOLTON J R. A solar-driven UV/chlorine advanced oxidation process[J]. *Water Research*, 2012, 46(17): 5672-5682.
- [14] ROSENFELDT E, BOAL A K, SPRINGER J, *et al.* Comparison of UV-mediated advanced oxidation[J]. *American Water Works Association*, 2013, 105(7): 29-33.
- [15] ZHANG W Q, ZHOU S Q, SUN J L, *et al.* Impact of chloride ions on UV/H₂O₂ and UV/persulfate advanced oxidation processes[J]. *Environmental Science and Technology*, 2018, 52(13): 7380-7389.
- [16] KOIVUNEN J, HEINONEN-TANSKI H. Inactivation of enteric microorganisms with chemical disinfectants, UV irradiation and combined chemical/UV treatments[J]. *Water Research*, 2005, 39(8): 1519-1526.
-
- 作者简介: 冉治霖(1980—), 男, 河南郑州人, 博士, 副教授, 主要研究方向为饮用水消毒及污染控制技术。
- E-mail: zhilinran@126.com
- 收稿日期: 2020-02-07
- 修回日期: 2020-05-20

(编辑: 任莹莹)