

УДК 577.359, 614.8

И. М. Центер

ФГБУН Байкальский институт природопользования СО РАН, Улан-Удэ

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ПОВЕРХНОСТИ
ВЫСОКОЧАСТОТНЫМ УЛЬТРАЗВУКОМ**

Ключевые слова: обеззараживание поверхности, высокочастотный ультразвук, инактивация, клетки *Bacillus cereus*, споры *Bacillus cereus*.

*В работе показана высокая эффективность высокочастотного ультразвука частотой 1,7 МГц для обеззараживания поверхности стекла, зараженной вегетативными клетками и спорами *Bacillus cereus*.*

I. Tsenter

Baikal Institute of Nature Management SB RAS, Ulan-Ude

**EFFICIENCY OF SURFACE DISINFECTION USING HIGH-FREQUENCY
ULTRASOUND**

Key words: surface disinfection, high-frequency ultrasound, inactivation, *Bacillus cereus* cells, *Bacillus cereus* spores.

*This paper shows the high efficiency of high-frequency ultrasound (frequency 1,7 MHz) for disinfection of glass surface, contaminated with cells and spores of *Bacillus cereus*.*

Введение. Для обеспечения санитарно-эпидемиологической безопасности и предотвращения микробиологического загрязнения на предприятиях пищевой индустрии, в медицинских учреждениях, клинических и бактериологических лабораториях необходимо регулярное и эффективное обеззараживание внутренних поверхностей помещений, оборудования и предметов различного назначения. На практике наиболее широко используется реагентная обработка, основанная на прямом контакте поверхностей с водными растворами дезинфектантов или 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 высокую стоимость, и, как правило, раздражающий запах. Существенными недостатками озонирования является невозможность использования метода в присутствии

людей, необходимость проводить обеззараживание в герметичном помещении и повышенный контроль техники безопасности [4]. При обеззараживании ультрафиолетовым светом используются ртутные лампы, содержащие токсичную металлическую ртуть. Для интенсификации процессов инактивации патогенной микрофлоры на поверхности большой потенциал имеют комбинированные окислительные процессы, или АОП («Advanced Oxidation Processes»), к которым относится ультразвуковая (УЗ) обработка. Известно, что при этом образуются высокореакционноспособные радикалы, из которых гидроксильный радикал считается наиболее важным агентом, обеспечивающим инактивацию клетки [13]. К настоящему времени большинство исследований инактивации микроорганизмов ультразвуковым воздействием проведено, главным образом, в жидких средах. Например, инактивация 99,7% *Pseudomonas spp.* установлена ранее при обработке сточных вод низкочастотным УЗ (24 кГц) [8]. Эффек-

тивность инактивации *E. coli* IAM 12058 и *Streptococcus mutans* JCM 5175 в суспензии проведена с применением УЗ частотой 500 кГц [10]. После обработки молока УЗ (20 кГц) наблюдалась инактивация 99% клеток *E. coli* и *Saccharomyces cerevisiae* [7]. Инактивация *E. coli* была также выявлена при обработке воды низкочастотным УЗ [11]. Однако, инактивирующее воздействие капель воды, обработанных ультразвуком (как высокочастотным, так и низкочастотным) на микробные клетки, находящиеся на твердых поверхностях, практически не исследовано. В связи с этим, целью данной работы являлось изучение эффективности обеззараживания поверхности стекла с использованием высокочастотного ультразвука.

Условия и методы исследования.

В качестве модельного тест-организма была взята бактериальная культура *Bacillus cereus* (*B. cereus*) в виде вегетативных клеток и спор, выделенная ранее из пруда-аэратора БЦБК [2]. *Bacillus cereus* – оппортунистический патоген, вызывающий пищевые токсикоинфекции, а также является близкородственным видом возбудителю сибирской язвы *B. anthracis*. Для получения вегетативных клеток культуру *B. cereus* 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 час. Споры *B. cereus* получали из семисуточной культуры на синтетической среде, способствующей спорообразованию [3]. Обеззараживание поверхности стекла осуществляли с помощью высокочастотного ультразвука частотой 1,7 МГц.

Вегетативные клетки и споры *B. cereus* были приготовлены методом предельных разведений из односуточной и семисуточной культуры, соответственно. На исходную стерильную поверхность стекла наносили 20 мкл бактериальной суспензии (клетки или споры *B. cereus*), высушивали ее при 37°С в течение 15 мин для получения биопленки с плотностью 10^3 , 10^4 и 10^5 коло-

ниеобразующих единиц (КОЕ) на 1 см². Стекло с биопленкой помещали на металлическую подложку, располагали ее над резервуаром со стерильной водой, которая подвергалась воздействию высокочастотного УЗ. Для оценки эффективности обеззараживания клетки контрольных (не обработанных УЗ) и опытных образцов смывали со стекла, суспендировали в стерильной воде, высевали на агаризованную питательную среду (мясо-пептонный агар) в 3-5 повторностях и инкубировали при 37°С в течение 24 час для подсчета выживших КОЕ. Эффект оценивали путем сравнения числа КОЕ выживших клеток опытных и контрольных вариантов.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе эксперимента во время воздействия высокочастотного УЗ на воду в резервуаре происходило распыление и осаждение мелкодисперсных частиц воды на зараженную поверхность стекла, в результате чего наблюдался эффект обеззараживания. Известно, что высокочастотные УЗ колебания фокусируются в слое жидкости и вызывают распыление мелкодисперсных частиц воды с размерами около 3...5 мкм [5]. При этом под воздействием УЗ 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 [1]. При интенсивном акустическом схлопывании кавитационных пузырьков (кратковременная кавитация) во время сжимающей фазы ультразвуковой волны возникают физические и химические эффекты [9, 10, 12]. Химический эффект заключается в генерировании высокорекреационноспособных гидроксильных радикалов внутри схлопывающихся пузырьков [10, 12, 14]. Образующиеся при схлопывании пузырьков радикалы разрушают клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану с последующим клеточным лизисом [14].

Установлено, что вегетативные клет-

ки *B. cereus*, находящиеся на твердой поверхности, являются более чувствительными к инактивирующему воздействию капель воды, обработанных высокочастотным УЗ, чем споры *B. cereus*. Это обусловлено строением клеточной стенки и содержанием внутриклеточных компонентов. Так, при исходной численности клеток *B. cereus* 10^3 КОЕ/см² полная инактивация достигалась после 25 мин обработки, при 10^4 КОЕ/см² – после 30 мин обработки, а при максималь-

ной численности (10^5 КОЕ/см²) продолжительность обработки увеличивалась до 40 мин. При этом в течение первых 15 мин инактивационный эффект не наблюдался. Полагаем, что выраженное плато на кривых выживания при малых временах УЗ обработки обусловлено эффектом «экранирования», при котором нижние слои клеток экранируются верхними и требуется более продолжительное время обработки для достижения их полной инактивации (рис.).

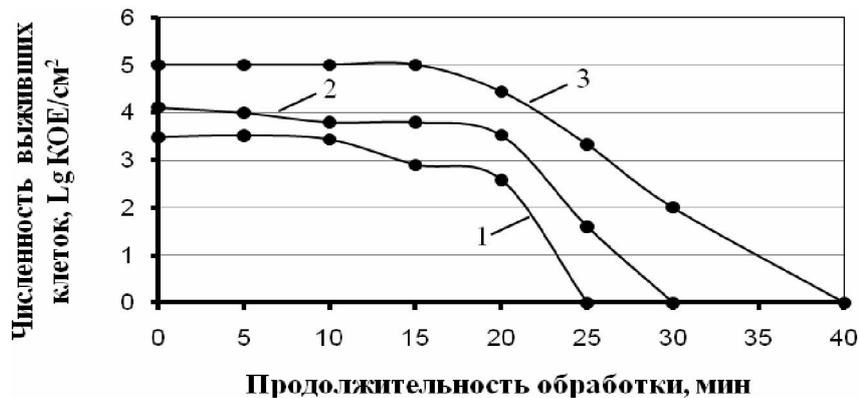


Рисунок – Зависимости численности выживших клеток от продолжительности УЗ обработки при исходной численности 10^3 (1), 10^4 (2) и 10^5 КОЕ/см² (3)

Эффект обеззараживания поверхности, зараженной спорами, с помощью высокочастотного УЗ не отмечен. Полагаем, что помимо эффекта экранирования, это обусловлено строением споры. Как известно, наружная оболочка споры состоит из полипептидов, под которой располагается кора (кортекс), состоящая из многослойного пептидогликанового остова (муреина – нерастворимого структурного компонента). Каркас споры отличается от каркаса стенок вегетативных клеток не только строением и составом, но и степенью сшивки [6]. В связи с этим, споры *B. cereus* являются более резистентными к инактивирующему воздействию распыленных капель воды, обработанных УЗ.

Таким образом, полученные результаты на примере клеток *B. cereus* свидетельствуют об эффективности воздействия капель воды после обработки высокочастотным УЗ для обеззараживания поверхности стекла, содержащей до 10^5 КОЕ/см². Несмотря на эффект экра-

нирования, возникающий на начальных стадиях обеззараживания (при обработке высококонцентрированных загрязнений), нами была достигнута 100% инактивация клеток *B. cereus* на поверхности стекла.

Предложения. Предложенный метод инактивации высокочастотным ультразвуком в непрерывном режиме воздействия может быть использован для эффективного обеззараживания поверхностей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ в рамках проекта № 12-08-31303 мол_а.

Библиографический список

1. Бронин Ф. А. Стерилизация изделий ультрафиолетом совместно с ультразвуком. Физические основы. – 2011 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.b6405.h16.ru/cavit.html>.
2. Матафонова Г. Г. *Bacillus cereus* – микроорганизм-деструктор 2,4-дихлорфенола / Г. Г. Матафонова, Г. С. Ширапова, С. Zimmer,

- G. W. Kohring, В. Б. Батоев, В. Ж. Цыренов // Известия РАН. Серия биологическая. – 2007. – № 5. – С. 534-538.
3. Мулюкин А. Л. Образование покоящихся форм *Bacillus cereus* и *Micrococcus luteus* / А. Л. Мулюкин, К. А. Луста, М. Н. Грязнова, А. Н. Козлова, М. В. Дужа, В. И. Дуда, Г. И. Эль-Регистан // Микробиология. – 1996. – Т. 65. – № 6. – С. 782–789.
4. Проект–М. Озон, физико–химические свойства, применение. – 2011 [Электронный документ]. – Режим доступа: www.proektm.ru/encicl/ozon.html.
5. Хмелев В. Н. Разработка и исследование новых принципов построения мелкодисперсных ультразвуковых распылителей вязких жидкостей / В. Н. Хмелев, А. В. Шалунов, Д. В. Генне, А. В. Шалунова, Р. Н. Голых // Известия Томского политехнического университета. – 2011. – Т. 319. – № 4. – С. 158-163.
6. Шлегель Г. Общая микробиология: перевод с нем. – М.: Мир, 1987. – 567с.
7. Cameron M. Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound / M. Cameron, L.D. McMaster, T.J. Britz // Ultrasonics Sonochemistry. – 2008. – № 15 (6). – P. 960– 964.
8. Drakopoulou S. Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater / S. Drakopoulou, S. Terzakis, M.S. Fountoulakis, D. Mantzavinos, T. Manios. // Ultrasonics Sonochemistry. – 2009. – № 16. – P. 629– 634.
9. Joyce E. 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 / E. Joyce, S.S. Phull, J.P. Lorimer, T.J. Mason // Ultrasonics Sonochemistry. – 2003. – № 10. – P. 315 – 318.
10. Koda S. Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500 kHz / S. Koda, M. Miyamoto, M. Toma, T.Matsuoka, M. Maebayashi // Ultrasonics Sonochemistry. – 2009. – № 16. – P. 655– 659.
11. Lee H. Inactivation of *Escherichia coli* cell with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: Microbial responses and kinetics modeling / H.Lee, B. Zhou, W. Liang, H. Feng, S. E. Martin // Journal of Food Engineering. – 2009. – № 93. – P. 354 – 364.
12. Mason T.J. New evidence for the inverse dependence of mechanical and chemical effects on the frequency of ultrasound / T.J. Mason, A.J. Cobley, J.E. Graves // Ultrasonics Sonochemistry. – 2011. – № 18. – P. 226 – 230.
13. Olvera M. Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water using ultrasonic treatment / M. Olvera, A. Eguia, O.Rodriguez, E. Chong, S.D. Pillai, K.Ilangovan // Bioresource Technology. – 2008. – № 99. – P. 2046 – 2049.
14. Wu Xiaoge. Evaluation of the mechanisms of the effect of ultrasound on *Microcystis aeruginosa* at different ultrasonic frequencies / Wu Xiaoge, E.M. Joyce, T.J. Mason // Water Research. – 2012. – № 46. – P. 2851 – 2858.