

避光处理对污水紫外线消毒后大肠杆菌光复活的影响研究

郭美婷^{*}, 胡洪营^{*}, 刘文君

(清华大学环境科学与工程系, 北京 100084)

摘要:以大肠杆菌为受试菌种, 研究了避光处理对紫外线消毒后三级出水中细菌光复活的影响。将紫外线消毒后的水样避光放置一定时间后再置于光复活条件下, 研究了大肠杆菌的复活特性。结果表明, 避光放置 6 h 以内, 见光后大肠杆菌的光复活能力即刻恢复, 并最终达到与非避光处理基本相同的最大复活值; 5 mJ/cm^2 和 20 mJ/cm^2 紫外线剂量照射后, 最大复活百分比分别为 31.1% 和 0.4%, 复活速率分别为 $1.67 \times 10^4 \text{CFU} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$ 和 $125 \text{CFU} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$ 。延长避光时间至 24 h, 5 mJ/cm^2 和 20 mJ/cm^2 紫外线剂量照射后的大肠杆菌见光后, 最大复活百分比分别减小到 10.0% 和 0.3%, 复活速率分别减小到 $830 \text{CFU} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$ 和 $20 \text{CFU} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$ 。以上结果表明, 延迟消毒后出水见光时间, 只能在一定程度上推迟或削弱大肠杆菌的光复活, 并不能有效保证复活受到抑制, 即紫外线消毒后出水中的微生物仍然存在高的复活风险。

关键词:污水再生利用; 污水消毒; 紫外线; 大肠杆菌; 光复活

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)06-1644-05

Dark Treatment Effects on Photoreactivation Characteristics of *Escherichia coli* in a Tertiary Effluent Disinfected by UV

GUO Mei-ting, HU Hong-ying, LIU Wen-jun

(Department of Environmental Science & Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The effect of dark treatment on photoreactivation of *Escherichia coli* in a tertiary effluent disinfected by UV was studied. The effluent of sand filtration of a sewage treatment plant was disinfected by UV, kept in darkness for a period of time, and then put under photoreactivating light to investigate the photoreactivation. The experimental results indicated that the photoreactivation potential could recover immediately after water samples were kept in darkness for less than 6 h. The percentage photoreactivation of the water samples disinfected by UV with doses of 5 mJ/cm^2 and 20 mJ/cm^2 were 31.1% and 0.4%, respectively, and the photoreactivation rates were $1.67 \times 10^4 \text{CFU} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$ and $125 \text{CFU} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$. When dark treatment time was prolonged to 24 h, the percentage photoreactivation and photoreactivation rates were lowered to 10.0% and 0.3%, $830 \text{CFU} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$ and $20 \text{CFU} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$, respectively. Those suggested that photoreactivation can only be weakened, but can not be controlled completely even after being kept in darkness for 24 h. So the safety concern on photoreactivation after UV disinfection of wastewater should be taken into account.

Key words: wastewater reclamation; wastewater disinfection; ultraviolet irradiation; *Escherichia coli*; photoreactivation

紫外线消毒由于其灭菌广谱性、有害消毒副产物少、操作安全等优势成为氯消毒重要的取代工艺^[1~7]。但是紫外线消毒不能提供持久的消毒效果, 使得消毒出水存在微生物风险性。很多被紫外线照射后的微生物, 可以在可见光照射下修复紫外线造成的 DNA 损伤, 重新获得活性, 从而削弱消毒效果, 威胁消毒出水的安全性。这种依靠可见光修复 DNA 损伤的现象叫做光复活^[8,9]。光复活是紫外线消毒保障污水再生利用微生物安全性的屏障, 如何从工程上控制光复活成为紫外线消毒技术能否在污水再生过程中广泛应用的关键之一。

目前, 有关光复活现象及机制的研究较多^[10~18], 但关于控制光复活的技术研究^[18~21]还很有限。主要的控制技术包括添加化学药剂和改进紫外

线技术及消毒操作等。

Quek 等^[19]研究结果表明, 0.5 mg/L 的氯胺可以在 1 h 内控制中压灯照射后的大肠杆菌光复活, 增加氯胺浓度至 1 mg/L 在 6 h 内未检测到光复活。刘佳等^[20]研究发现, 紫外线消毒后投加氯或过氧乙酸可以控制光复活现象。但是添加化学药剂增加了工程操作的复杂性, 同时又引入化学药剂的不安全性, 并不是值得推荐的技术。

从紫外线技术本身来控制光复活的技术包括增大紫外线剂量或使用较高的紫外线光强^[21,22]。也有

收稿日期: 2007-06-10; 修订日期: 2007-09-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(20477021); 国家自然科学基金-JST 重大国际合作项目(20510076); 日立合作项目

作者简介: 郭美婷(1982~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为污水再生利用, E-mail: gmt00@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人, E-mail: hyhu@tsinghua.edu.cn

研究发现使用中压灯可以在一定程度上控制光复活^[23]。

本研究从光复活机制分析入手,尝试通过利用消毒操作的调整控制光复活。目前一般认为光复活过程分2步^[22]。第1步,光复活酶和紫外线照射引起的嘧啶二聚体结合成络合物,此步不需要光照;第2步,在近紫外或可见光照射下,复活酶利用光能修复好DNA并将其释放。由此可见,光照在光复活过程中起到重要的作用。将紫外线照射后的水样避光放置一定时间后再置于复活光下,推迟其接触光照的时间,使得光复活酶和嘧啶二聚体的络合物不能及时拆解释放,可能会影响光复活的程度。从工程角度出发,需要了解将紫外线消毒后出水在黑暗中储存一定时间后再回用于景观水体等用途后是否能够控制光复活,从而为工程应用提供参考。

本研究分析了在三级处理出水条件下,紫外线消毒后、见光前,避光放置处理对大肠杆菌光复活的影响,以期在污水再生利用过程中为有效控制紫外线消毒后微生物的光复活提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验菌种及水样

受试菌种:大肠杆菌 CGMCC 1.3373,购于中国科学院微生物研究所。

试验水样:取北京市G污水处理厂三级处理的砂滤出水,经过0.22 μm膜过滤除菌。监测COD、DOC、浊度、pH和UV₂₅₄等水质参数,检测方法依据水质监测标准方法^[24]。水质如表1所示。

表1 试验所用水样的水质
Table 1 Quality of tertiary treated effluent

项目	COD /mg L ⁻¹	DOC /mg L ⁻¹	UV ₂₅₄	浊度 /NTU	pH
三级出水	66~87	1.2~3.9	0.11~0.13	0.3~1.0	7.3~7.4

将-80℃冰箱中的冰冻菌种融化后接种50 μL于50 mL营养肉汤培养基中,37℃、130 r/min振荡培养16 h,10 000 r/min离心10 min,弃去上清液,用灭菌生理盐水冲洗2次,将细胞重悬于100 mL上述预处理除菌的砂滤出水中得到菌悬液。根据试验要求配制一定初始浓度的菌悬液作为试验水样。

1.2 紫外线照射试验

紫外线照射试验采用紫外平行光束仪进行。紫外平行光束仪内装有1根40 W低压紫外灯管,距离照射水样33 cm。UV-B紫外辐照仪测定试验水样表

面接受到的紫外线光强(254 nm)。分光光度计(型号UV-2401PC)测定试验水样的吸光度(254 nm),根据紫外线照射试验的标准方法^[25]确定平均光强,从而根据式(1)计算设计紫外线剂量下所需的照射时间。

$$\text{紫外线剂量}(\text{mJ}/\text{cm}^2) = \text{平均光强}(\text{mW}/\text{cm}^2) \times \text{照射时间}(\text{s}) \quad (1)$$

取15 mL试验水样于直径60 mm的灭菌培养皿中,放入转子,将培养皿置于紫外平行光束仪正下方,磁力搅拌器的上面,使水样接受设计时间的紫外线照射。

1.3 光复活试验

以日光灯(40 W)为光源研究光复活特性。测得365 nm处光强^[11]为20 μW/cm²。将紫外线照射后的水样用锡箔纸包裹,分别避光放置0、2、4、6 h后再置于日光灯下照射,各水样分别在紫外线消毒后的0、2、4、6、8、12、24、48和72 h检测菌的浓度。延长避光时间至24 h,分别检测在紫外线消毒后0、12、24、32、36、48和72 h时各水样中菌的浓度。

1.4 细菌计数方法

1 mL一定稀释度的水样和一定量的融化后温度不高于40℃的营养琼脂培养基混合,迅速摇匀,待培养基凝固后将平板倒置于37℃培养箱中培养24 h,计菌落数。每个样品做3个平行样。

1.5 紫外线消毒后微生物光复活的评价方法

本研究利用最大复活值、复活百分比^[17]和复活速率表征光复活程度。

最大复活值为大肠杆菌充分光复活后达到的菌浓度。

$$\text{复活百分比} = \frac{(N_p - N)}{(N_0 - N)} \times 100\%$$

$$\text{复活速率} = (N_p - N) / \Delta t$$

式中, N_0 :紫外线照射前水样中的菌数(CFU/mL); N :紫外线照射后水样中的菌数(CFU/mL); N_p :光复活后水样中的菌数(CFU/mL); Δt :接触复活光的时间(h)。

2 结果与讨论

2.1 短期避光放置对紫外线照射大肠杆菌后光复活的影响

将经过紫外线消毒(紫外线剂量为5 mJ/cm²和20 mJ/cm²)的水样分别于黑暗中避光放置0、2、4和6 h后,再置于灯下,研究避光放置处理对大肠杆菌光复活的影响,结果如图1所示。

从图1可以看出,紫外线剂量为5 mJ/cm²的条

件下,消毒后避光放置时间对大肠杆菌的复活有一定影响.经过紫外线消毒的水样直接接触光照后,即刻开始光复活,在 6 h 时达到最大复活值(10^5 CFU/mL),复活后菌数较紫外线即时灭活数增加 3 lg 多 CFU/mL,最大复活百分比为 31.1%.将紫外线消毒后水样于黑暗中避光放置期间,大肠杆菌由于没有光的催化作用使得光复活现象受到抑制,从而进行另一种可能的修复机制即暗修复.这一现象同以前的研究结果相类似^[13],暗修复作用不显著,水样避光保存期间菌落数基本未变.

但是,当避光放置的水样置于光照下后,复活逐渐发生.黑暗放置 2 h 对后期的光复活影响较小,图 1(a)中结果显示大肠杆菌在光照 2 h 后即显示明显的复活能力,在见光 6 h 时也达到最大复活值,并且和未进行避光处理水样中的菌数基本一致.避光放置 4 h 和 6 h 的水样类似,在见光后也即开始复活,只是初始复活速率比未进行避光处理水样的复活速率慢,在 12 h 达到复活最大值.

避光放置 0、2、4、6 h 的水样在初始见光 2 h 内的复活速率不同,分别为 4 950、24 950、450 和 3 450 CFU·(mL h)⁻¹,但是从初始见光到达到复活最大值期间的平均复活速率基本相同,为 1.67×10^4 CFU·(mL h)⁻¹.

值得一提的是,经过不同避光放置时间处理的水样最大复活值基本接近.也就是说,避光处理只是暂时地控制了光复活,在紫外线消毒后 6 h 内,只要水样接触光照,即能发生光复活,一定时间后复活仍能达到未避光放置处理的水样光复活的极大值.这与 Kelner^[26]的结果略有不同.该研究发现将 *S. griseus* ATC3326 的孢子紫外线照射 20 min 后黑暗中 5 保存 4 h,再接触可见光后未检测到光复活.结论不同的原因可能是试验所用菌种、光复活光源及光照强度、试验温度均不同所致,而这些条件对光复活的影响很大^[18,22,26].本研究中发现避光放置只能控制避光期间菌数基本不增加,但是一旦接触复活光,复活现象即发生.也就是说,避光放置对光复活的控制并不理想.

增大紫外线剂量到 20 mJ/cm²,避光放置不同时间对于大肠杆菌的光复活影响如图 1(b)所示.结果与紫外线消毒剂量为 5 mJ/cm²的类似.水样在紫外线消毒后避光放置期间菌数基本不变,接触复活光后即开始复活.不同避光放置处理的水样光复活时达到最大值所需的时间延长,但是最大复活值仍然基本一致,为 10^3 CFU/mL,最大复活百分比为 0.4%.

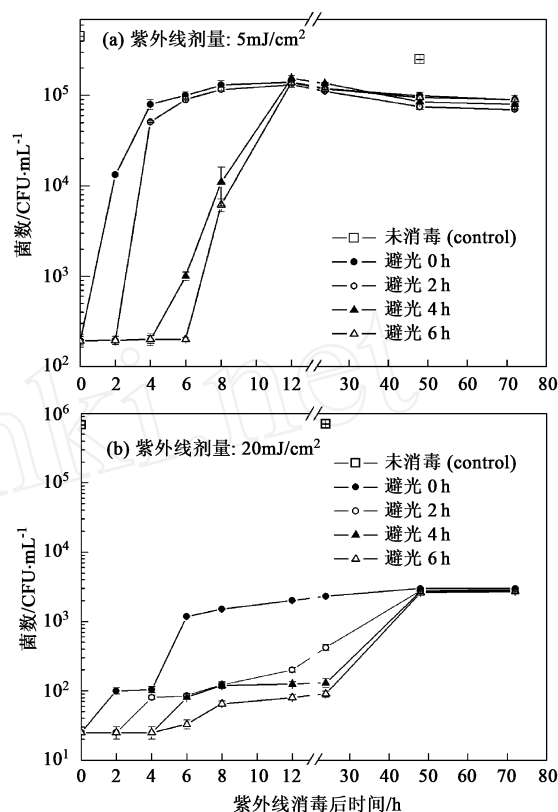


图 1 避光时间对紫外线消毒后 *E. coli* 光复活的影响

Fig. 1 Effect of darkness time on photoreactivation of *E. coli*

各水样从初始见光到达到复活最大值也具有近似的平均复活速率,约为 125 CFU·(mL h)⁻¹.

以上结果指出,在紫外线消毒后避光放置 6 h 以内再接触复活光后,大肠杆菌在不同程度上都表现出光复活能力.这表明,光复活酶与嘧啶二聚体结合后,并不因为不能及时得到光照而失去反应活性.只要存在复活光,本试验所选紫外线剂量照射后的大肠杆菌的复活即可以启动,并最终达到最大复活值.

比较紫外线剂量为 5 mJ/cm²和 20 mJ/cm²的结果可以看出,较高的紫外线剂量消毒后,水样最大复活值低于较低紫外线剂量消毒的水样的最大复活值.同时,达到最大复活值所需的光照时间更长,复活速率低.这意味着,高的紫外线剂量可能对大肠杆菌造成了更多的损伤,并且有些损伤无法修复.避光放置对损伤较大的细菌的光复活影响更大.

2.2 长时间避光放置对大肠杆菌光复活的影响

将避光放置的时间延长至 24 h,结果如图 2 所示.紫外线剂量为 5 mJ/cm²时,消毒后水样在避光放置的 24 h 内大肠杆菌数量基本维持不变,接受复活

光照射后大肠杆菌仍然表现出一定的复活能力. 见光 8 h 后单位体积内大肠杆菌数急剧增加, 在见光 12 h 时达到最大值, 即 10^4 CFU/mL, 复活百分比为 10.0%, 平均复活速率为 $830 \text{ CFU} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$. 同图 1 结果比较, 达到复活最大值所需的时间延长, 最大复活值有所降低, 复活速率也明显降低. 这表明, 较长时间的避光放置使得受紫外线损伤的菌不能得到及时修复, 虽然后期提供的复活光启动了光修复功能, 但是从最大复活值及达到最大复活值所需见光时间的角度判断, 其复活能力减弱. 但是 24 h 的避光放置仍没有完全抑制大肠杆菌的光复活.

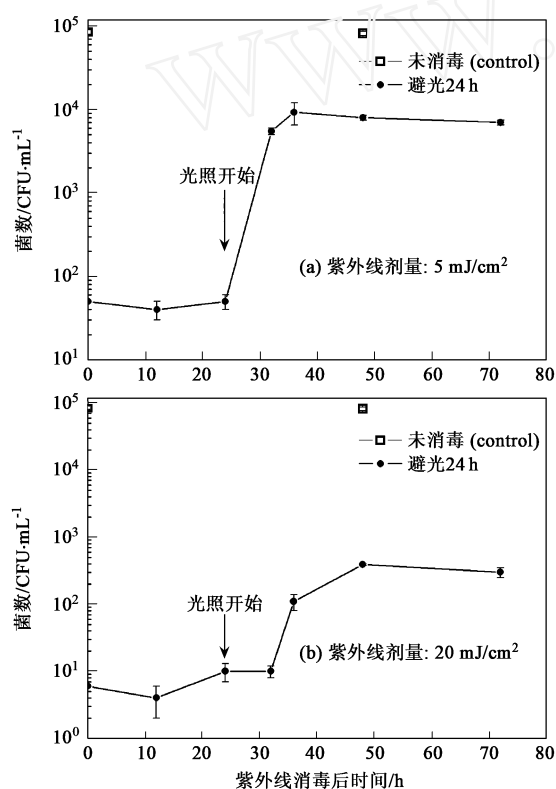


图2 紫外线消毒后避光 24 h 对 *E. coli* 光复活的影响

Fig. 2 Effect of detention in darkness for 24 h on photoreactivation of *E. coli*

同样, 将 20 mJ/cm^2 紫外线剂量照射后的大肠杆菌避光放置 24 h 后再置于光照下, 仍然检测到其光复活[图 2(b)]. 与 5 mJ/cm^2 照射后水样有所不同, 见光 8 h 菌落数基本未变, 直到见光 12 h 后才表现出明显的光复活, 见光 24 h 后达到复活最大值 500 CFU/mL , 复活百分比为 0.3%, 平均复活速率为 $20 \text{ CFU} \cdot (\text{mL} \cdot \text{h})^{-1}$. 这再次说明较高的紫外线剂量照射后的大肠杆菌损伤较大, 复活能力相对较弱.

比较短期和长时间避光放置对复活的影响结果可以看出, 短期(6 h 以内)的避光放置在 5 mJ/cm^2 和

20 mJ/cm^2 紫外线剂量照射后基本不能有效控制光复活, 试验后期各水样间复活结果无明显差异. 较长时间(24 h)避光放置可以在一定程度上减弱复活程度, 降低其复活速率和最大复活值, 但是仍不能完全抑制光复活.

3 结论

紫外线照射后的水样避光放置 6 h 以内, 接触光照后即可恢复复活活性. 避光时间越长, 初始紫外线剂量越大, 达到复活最大值所需的光照时间越长, 但是对同一紫外线剂量下, 不同避光放置处理的水样复活最大值基本一致. 延长避光时间至 24 h, 只能在一定程度上减弱复活程度, 仍然不能完全抑制光复活. 这表明, 延迟消毒后出水见光的时间并不能有效保证复活受到抑制, 即紫外线消毒后出水中的微生物仍然存在高的复活风险. 由于污水回用和排放过程中难以避免与阳光的接触, 因此光复活的问题不容忽视, 有待深入研究.

参考文献:

- [1] 张辰, 张欣, 吕东明, 等. 污水消毒标准及紫外线消毒技术应用[J]. 给水排水, 2003, 29(12): 1-3.
- [2] Reed D. Selecting alternatives to chlorine disinfection[J]. Pollution Engineering, 1998, 30(9): 48-51.
- [3] 张立成, 傅金祥. 紫外线消毒工艺与应用概况[J]. 中国给水排水, 2002, 18(2): 38-40.
- [4] 张欣. 污水处理中的紫外线消毒技术[J]. 给水排水, 2002, 28(11): 31-34.
- [5] Lazarova V, Savoye P, Janex M L, et al. Advanced wastewater disinfection technologies: state of the art and perspectives[J]. Water Science Technology, 1999, 40(4): 203-213.
- [6] Liberti L, Lopez A, Notarnicola M, et al. Comparison of advanced disinfecting methods for municipal wastewater reuse in agriculture[J]. Water Science & Technology, 2000, 42(1-2): 215-220.
- [7] Linden K G, Shin G A, Faubert G, et al. UV Disinfection of *Giardia lamblia* Cysts in Water[J]. Environmental Science Technology, 2002, 36(11): 2519-2522.
- [8] James E C. Photoreactivation[J]. DNA Repair, 2003, 2: 629-638.
- [9] Hijnen W A M, Beerendonk E F, Medema G J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan(o) cysts in water: A review[J]. Water Research, 2006, 40: 3-22.
- [10] Hassen A, Mahrour M, Ouzari H, et al. UV disinfection of treated wastewater in a large-scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device[J]. Bioresource Technology, 2000, 74: 141-150.
- [11] Kashimada K, Kamiko N, Yamamoto K, et al. Assessment of photoreactivation following ultraviolet light disinfection[J]. Water Science & Technology, 1996, 33(10-11): 261-269.
- [12] Oguma K, Katayama H, Mitani H, et al. Determination of pyrimidine dimers in *Escherichia coli* and *Cryptosporidium parvum*

- during UV light inactivation, photoreactivation and dark repair[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**(10):4630-4637.
- [13] Hu J Y, Chu X N, Quek P H, et al. Repair and regrowth of *Escherichia coli* after low- and medium-pressure ultraviolet disinfection[J]. Water Science & Technology:Water Supply, 2005, **5**(5):101-108.
- [14] Zimmer J L, Slawson R M. Potential repair of *Escherichia coli* DNA following exposure to UV radiation from both medium- and low-pressure UV sources used in drinking water treatment[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(7):3293-3299.
- [15] Oguma K, Katayama H, Ohgaki S. Photoreactivation of *Escherichia coli* after low- or medium-pressure UV disinfection determined by Endonuclease Sensitive Site assay[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(12):6029-6035.
- [16] Oguma K, Katayama H, Ohgaki S. Photoreactivation of *Legionella pneumophila* after inactivation by low- or medium-pressure ultraviolet lamp[J]. Water Research, 2004, **38**:2757-2763.
- [17] Zimmer J L, Slawson R M, Huck P M. Inactivation and potential repair of *Cryptosporidium parvum* following low- and medium-pressure ultraviolet irradiation[J]. Water Research, 2003, **37**:3517-3523.
- [18] Liltved H, Landfald B. Influence of liquid holding recovery and photoreactivation on survival of ultraviolet-irradiated fish pathogenic bacteria[J]. Water Science & Technology, 1995, **30**(5):1109-1114.
- [19] Quek P H, Hu J Y, Chu X N, et al. Photoreactivation of *Escherichia coli* following medium-pressure ultraviolet disinfection and its control using chloramination[J]. Water Science & Technology, 2006, **53**(6):123-129.
- [20] 刘佳,黄翔峰,陆丽君,等. 紫外消毒出水的微生物光复活及其控制技术[J]. 中国给水排水, 2006, **22**(15):1-8.
- [21] 张永吉,刘文君. 紫外线消毒对光复活时大肠杆菌活性的影响[J]. 中国给水排水, 2006, **22**(17):46-49.
- [22] Lindenauer K G, Darby J L. Ultraviolet disinfection of wastewater: effect of dose on subsequent photoreactivation[J]. Water Research, 1994, **28**(4):805-817.
- [23] Kalisvaart B F. Re-use of wastewater: preventing the recovery of pathogens by using medium-pressure UV lamp technology[J]. Water Science & Technology, 2004, **50**(6):337-344.
- [24] Bolton J R, Linden K G. Standardization of methods for fluence (UV Dose) determination in bench-scale UV experiments[J]. Journal of Environmental Engineering, 2003, **129**:209-216.
- [25] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京:中国环境科学出版社, 2002. 15-80.
- [26] Kelner A. Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1949, **35**(2):73-79.