

紫外线消毒后微生物的光复活特性及其评价方法

郭美婷, 胡洪营*

(清华大学环境科学与工程系环境生物学研究所, 北京 100084)

摘 要 随着紫外线消毒技术应用的日益广泛, 污水紫外线消毒后微生物的光复活特性值得关注。文章综述了光复活的机理、具有光复活能力的微生物种类、影响光复活的因素以及光复活的评价方式等, 以期为系统研究光复活提供参考。具有复活能力的微生物种类较多, 主要和体内所含光复活酶相关。影响光复活的因素涉及微生物、污水特性、紫外线系统及光复活条件四方面。评价光复活的方式至今没有统一标准。光复活及其对污水消毒的影响有待进一步深入研究。

关键词 紫外线; 消毒; 光复活

中图分类号 X172 **文献标志码** A **文章编号** 1003-6504(2009)04-0077-04

Photoreactivation Characteristics and Its Evaluation Method after UV Disinfection

GUO Mei-ting, HU Hong-ying*

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

Abstract : Attentions should be paid to photoreactivation in wastewater disinfection with UV technology as the technology is widely applied. Mechanism, microorganisms with photoreactivation capability, affecting factors and evaluation methods of photoreactivation were reviewed, hoping to offer a reference for deep and systematic study on photoreactivation. Microorganisms with photoreactivation enzyme had the ability of photoreactivation which was affected by microorganisms, characteristics of wastewater, UV system and photoreactivation condition. Since there is a lack of standard evaluation method of photoreactivation, the deep study of photoreactivation and its effect on wastewater disinfection is needed.

Key words : UV ; disinfection ; 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取代工艺的重要技术。但是紫外线消毒不能提供持久的消毒效果, 使得消毒出水存在一定的微生物风险。很多被紫外线照射后的微生物在可见光照射下可以修复紫外线造成的损伤, 重新获得活性, 从而削弱消毒效果, 威胁消毒的安全性。这种依靠可见光修复 DNA 损伤的现象叫做光复活^[1]。紫外线消毒后微生物的复活现象几乎在紫外线技术刚刚开始推广应用的同时即被发现, 随着紫外线技术的发展而被逐步深入的研究^[2-22]。本文综述了光复活的机理、具有光复活能力的微生物种类、影响光复活的因素以及光复活的评价方式等, 以期为系统研究微生物的光复活、保证紫外线消毒的安全性提供参考。

1 光复活机理

紫外线照射微生物后, 在微生物 DNA 链上主要

形成嘧啶二聚体等光化学产物, 阻止 DNA 的复制, 从而使微生物失活^[23]。形成的嘧啶二聚体可通过多种途径进行修复, 从而发生不同程度的复活, 这些途径包括光复活和暗修复 (主要包括切除修复和重组修复) 等。这里仅对光复活机理进行分析。

目前, 关于光复活的研究较多, 一般认为, 光复活的发生包括以下两步^[2] (见图 1) :

第一步 光复活酶-嘧啶二聚体络合物的形成。一个光复活酶 (PRE) 结合一个嘧啶

二聚体形成一个络合物 (complex)。此过程可逆, 但是络合物的形成反应在动力学上极易发生 ($k_1 \gg k_2$)。这一步不需要光照。络合物的形成速度和温度、pH 及离子强度等有关。

第二步 光复活酶及修复好的 DNA 的释放。光照促使光复活酶起到催化作用, 导致嘧啶二聚体的解聚, 形成嘧啶单体, 同时光复活酶从光复活酶-嘧啶二

收稿日期 2008-03-20 修回 2008-06-25

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)

作者简介 郭美婷 (1982-), 女, 博士生, 主要研究方向为污水再生利用, (电话) 010-62797265 (电子信箱) gmt00@mails.tsinghua.edu.cn * 通讯作者, (电子信箱) hyhu@tsinghua.edu.cn

聚体络合物中释放出来。嘧啶二聚体恢复为初始的单分子的反应速率取决于复活光的能量以及相关的反应动力学。对不同的微生物,起催化作用的复活光波长各不相同,但一般都在 310~490nm 之间。

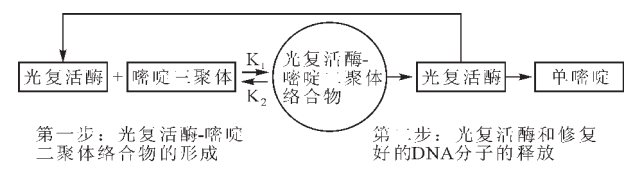


图1 光复活两步反应机制
Fig.1 Two-step reaction mechanism for photoreactivation

由于嘧啶二聚体解聚为单嘧啶的反应一般在合适的光照条件下千分之一秒内即可发生,故光复活的程度主要取决于形成光复活酶-嘧啶二聚体络合物的

数量(也即第一步)。络合物的数量受限于每个细胞中光复活酶的数量及可利用性。有限的光复活酶只有通过光复活酶的再利用而实现较高的复活率。足够长的光照时间能使 DNA 得到修复并释放,同时使光复活酶再生(第二步),得以与剩下的二聚体形成新的络合物(第一步)再次催化嘧啶二聚体解聚。

2 具有复活能力的微生物种类及最适复活波长

微生物的光复活能力与光复活酶的作用相关。光复活酶在生物中广泛存在,如在细菌、蓝绿藻、真菌、高等植物以及所有主要脊椎动物群中都有发现,但对有胎盘的哺乳动物可能是个例外。目前对这些例外产生的原因还没有探明。表 1 列出了已有研究中发现具有光复活能力的微生物^[2-21]。

表 1 微生物的光复活
Table 1 Microorganisms with photoreactivation

复活性	微生物
有光复活	细菌 <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Aerobacter</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterococci faecalis</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Streptomyces</i> .
	真菌 <i>Penicillium</i> , <i>Saccharomyces</i> .
	原生动物 <i>Cryptosporidium parvum</i> , <i>Giardia lamblia</i>
未观测到光复活	细菌 <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Diplococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Micrococcus radiodurans</i> , <i>Enterococci hirae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
	噬菌体 <i>Bacteriophage</i> , <i>Somatic coliphages</i>
不确定	细菌 <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> strain O157:H7, <i>Streptococcus faecalis</i> .

同一属不同种的细菌的复活能力不尽相同。值得指出的是,不同的研究中,对同一种菌的光复活与否的结论并不相同。比如,Lindenauer 认为 *Bacillus subtilis* 没有光复活现象^[2],而 Hassen 研究观测到 *Bacillus subtilis* 有光复活的现象^[3]。对于 *E.coli* O157 H7,有研究未发现光复活现象^[2],而另一研究中发现低压灯照射后有光复活,中压灯照射后未检测到^[4]。另外,研究发现,尽管隐孢子虫可以复活,但是感染性并没有恢复^[5]。这意味着复活的微生物由于自身某些特性的丧失,其对环境安全的危害性可能会降低。复活后微生物特性的变化是值得关注的问题。

从表 1 可以看出,不同种类的微生物光复活特性不同,可能的原因之一是不同的微生物光复活所需的最适波长不同。但是确定微生物光复活最适波长的研究很有限。有研究表明,大肠杆菌光复活最适波长在 360nm 附近^[6-7],灰色链霉菌光复活的最适波长为 440nm^[7]。项圈藻的主要波长为 352.5 和 383nm^[8]。

3 影响因素

污水紫外线消毒后微生物的光复活存在四方面的影响因素。

(1) 光复活条件。包括可见光波长、光强、辐照时

间、紫外线照射后见光前的黑暗保存时间、温度等。产生光复活的最适光波长依微生物不同而不同,但一般都在 310~490nm 间。合适波长的光辐照时,光强越强、辐照时间越长,复活量一般越大^[9]。由于光复活需要光,不及时给与受紫外线损伤的微生物可见光,微生物的光复活能力将受到影响。有研究认为,见光之前黑暗保存不同时间,可以延迟光复活 15~20h 发生^[10]。Kelner 研究发现 *E.coli* 在紫外线照射后于黑暗中 37℃ 培养,可以使其丧失光复活的能力,同时光复活能力随黑暗培养时间的延长呈指数下降,培养 2~3h 会完全丧失光复活能力^[11]。由于光复活过程属于光化学反应,其反应速率的大小受温度的影响较大。有研究认为温度增加到 50℃的过程中复活率随着温度的增加而增加^[11]。但也有研究认为温度的影响并不显著^[10]。

(2) 微生物的种类。不同的微生物光复活能力不同,可能因为微生物所含有的光复活酶的数量不同,发生最大光复活所需的光波长不同等。同时 DNA 中含嘧啶碱基较多的微生物光复活能力较差,主要由于较易产生更多的嘧啶二聚体。

(3) 污水水质。水质影响因素主要有水中吸收可见光的物质种类及浓度、污水的营养水平、pH 及离子强度等。针对水中吸光物质对光复活的影响的研究未

见报道。水中存在低的营养物质时,可以使暗修复达到较高的水平,同时使光复活维持高复活水平较长时间^[10]。合适的 pH 和离子强度等协助维持菌的正常生理状态,利于光复活现象的发生。

(4) 紫外线消毒系统。所采用的紫外灯的种类及紫外线剂量显著影响光复活。低压灯主要发射 254nm 的光,专门破坏 DNA。而宽光谱的紫外线不仅破坏 DNA,而且对其他分子比如酶造成损伤。有研究结果表明,中压灯可以在一定程度上抑制复活现象的发生^[4]。另外,紫外线剂量越高,微生物受到紫

外线损伤程度越深,则复活所需要的时间越长,复活程度越低。

4 评价方法

光复活导致的最直接结果是单位体积水样中菌数的增加。为评价和比较光复活的程度,光复活研究领域中使用如下几种评价方法。

(1) 剂量减小因子 (Dose Reduction Factor) 法。Kelner 定义了“剂量减小因子”(DRF) 来定量评价微生物的光复活^[9]。

$$DRF = \frac{\text{不考虑光复活时微生物达到一定 log 存活率所需的紫外线照射剂量}}{\text{考虑光复活时微生物达到同样 log 存活率所需的紫外线照射剂量}}$$

DRF 值 ≤ 1。DRF 的概念已有直接的应用,即在考虑光复活的条件下预测达到一定消毒效果所需增加的紫外线照射剂量。

当紫外线剂量较高时,消毒出水的菌数接近或低于检测限,直接使用实际的 MPN (Most Probable Number,最大可能数) 值定义 DRF 和排放标准接轨,应用更有意义^[2]。

$$DRF = \frac{\text{不考虑光复活时微生物达到一定 MPN 值所需的紫外线照射剂量}}{\text{考虑光复活时微生物达到一定 MPN 值所需的紫外线照射剂量}}$$

此评价方法对于指导实际应用较有意义,但是由于不同条件下光复活发生与否及发生的程度均不同,所以该定义还存在模糊的地方,使得不同研究中的结果不易比较。

(2) 光复活率法。1951 年, Kelner 提出了另一种定量光复活的方法,即光复活率法。

安全性。

[参考文献]

[1] Cleaver J E. Photoreactivation[J]. DNA Repair,2003,2 :629-638.

[2] Lindenauer K G, Darby J L. Ultraviolet disinfection of wastewater :effect of dose on subsequent photoreactivation[J]. Water Research, 1994, 28 (4) :805-817.

[3] Hassen A, Mahrouk 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.

[4] Kalisvaart B F. Re-use of wastewater : preventing the recovery of pathogens by using medium-pressure UV lamp technology[J]. Water Science and Technology,2004,50 (6) :337-344.

[5] 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 Resource,2003,37 :3517-3523.

[6] Kashimada K, Kamiko N, Yamamoto K, et al. Assessment of photoreactivation following ultraviolet light disinfection [J]. Water Science and Technology,1996,33 (10-11) :261-269.

[7] Kelner A. Action spectra for photoreactivation of ultraviolet-irradiated *Escherichia coli* and *Streptomyces griseus* [J]. The Journal of General Physiology,1951,835-852.

[8] Han T, Sinha R P, Hader D P. UV-A/blue light-induced reactivation of photosynthesis in UV-B irradiated *Cyanobacterium*, *Anabaena* sp [J]. Journal of Plant Physiology, http://www.cnki.net

$$\text{光复活率}(\%) = \frac{N_{pr} - N}{N_0 - N} \times 100\%$$

其中, N_0 —紫外线照射前的微生物数 ; N —紫外线照射后存活的微生物数 ; N_{pr} —光复活后的微生物数。

因此,光复活率表示光复活的微生物占紫外线灭活的微生物的百分比。此方法表征了复活的能力和程度,有利于光复活的理论研究。

(3) Log 增加法。关于光复活的研究多采用 log 增加法来定量微生物复活的程度。这种方法中,光复活使得微生物的 log 存活率增加,增加量定义为

$$\text{Log 增加值} = \log(N_{pr}/N)$$

复活前的存活率为 $\log(N/N_0)$, 复活后的存活率为 $\log(N_{pr}/N_0)$ 。此方法关注光复活对存活率的影响,从而可以判断光复活的程度。

5 结语

尽管有关微生物的光复活研究至今已经历了半个世纪的历程,光复活研究领域仍然没有提出统一的研究条件和评价模式,使得不同研究的结果可比性较差。光复活的特性及对污水消毒的影响有待于更深入的研究,从而提出适用的控制措施,保证污水消毒的

2001,158 (11) :1403-1413.

- [9] Kelner A. Photoreactivation of ultraviolet -irradiated *Escherichia coli* with special reference to the dose-reduction principle and to ultraviolet-induced mutation[J]. Journal of Bacteriology, 1949, 58 (4) : 511-522.
- [10] Liltved H, Landfald B. Influence of liquid holding recovery and photoreactivation on survival of ultraviolet-irradiated fish pathogenic bacteria[J]. Water Science and Technology, 1995,30 (5) :1109-1114.
- [11] Kelner A. Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus conidia* from ultraviolet irradiation injury[A]. Proceedings of the National Academy of Sciences [C]. 1949, 35 (2) :73-79.
- [12] Mechsner K, Fleischmann T, Mason C A, et al. UV disinfection : short term inactivation and revival[J]. Water Science and Technology,1991, 24 (2) :339-342.
- [13] Hijnen W A M, Beerendonk E F, Medema G J. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo) cysts in water :A review[J]. Water Res,2006,40 : 3-22.
- [14] Chrték S, Popp W. UV disinfection of secondary effluents from sewage treatment plants[J]. Water Science and Technology, 1991,24 (2) :343-346.
- [15] Lazarova V, Savoye P, Janex M L. Advanced wastewater disinfection technologies : state of the art and perspectives [J]. Water Science and Technology,1999,40 (4) :203-213.
- [16] Hu J Y, Chu X N, Queck P H, et al. Repair and regrowth of *Escherichia coli* after low- and medium-pressure ultraviolet disinfection[J]. Water Science and Technology :Water Supply,2005,5 (5) :101-108.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Harris G D, Adams V D, Sorensen D L, et al. Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria [J]. Water Research,1987,25 (6) : 687-692.
- [22] 张立成,李相昆,傅金祥,等. 城市污水紫外线消毒光复活效应试验研究[J]. 给水排水, 2008,34 (5) :174-176.
- [23] 王睿,郭周义,曾常春. 紫外辐射引起 DNA 损伤的修复[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008,12 (2) :248-252.