

04;14

Антимикробное действие разряда с жидким катодом на электродную жидкость

© Ю.А. Баринов¹, И.Л. Кузикова², С.В. Зиновьева²,
С.М. Школьник¹, Н.Г. Медведева²

¹ Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург
E-mail: yury@mail.ioffe.ru

² Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности РАН (НИЦЭБ РАН)
E-mail: ngmedvedeva@gmail.com

Поступило в Редакцию 9 апреля 2015 г.

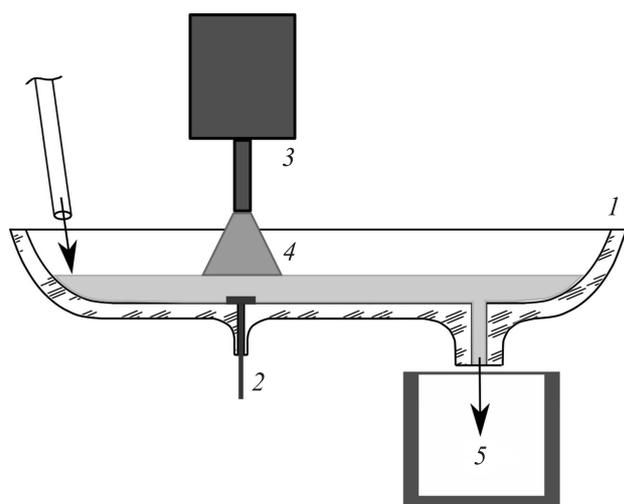
Изучено антимикробное воздействие разряда с жидким катодом при атмосферном давлении на электродную жидкость. Показано, что степень антимикробного воздействия разряда зависит как от режима обработки, так и от вида исследуемых тест-культур микроорганизмов. Наибольшую чувствительность к воздействию проявляют грамотрицательные бактерии *Pseudomonas fluorescens*. Дрожжеподобные грибы *Candida albicans* и грамположительные бактерии *Bacillus subtilis* более устойчивы к действию разряда. Увеличение длительности воздействия и повышения тока с 60 до 150 мА приводит к повышению ингибирующего действия на клетки *P. fluorescens* и *C. albicans*.

Интерес к исследованию воздействия неравновесной низкотемпературной плазмы (НТП) на биологические объекты в настоящее время необычайно высок [1,2]. Особый интерес вызывает плазма атмосферного давления, так как ее создание не требует использования вакуумного оборудования. Исследуется дезинфекция воды электрическими разрядами, генерируемыми НТП либо непосредственно в жидкости [3–6], либо над поверхностью жидкости, а также при воздействии потока рекомбинирующей плазмы [6–8]. Для генерации НТП используются разряды различного типа: импульсные дуги, барьерные и искровые разряды, ВЧ-разряды и т.д. Показана возможность эффективной инактивации различных микроорганизмов при относительно невысоком энергозатрате $10^2 - 2 \cdot 10^3$ Дж [9].

Однако используемые в настоящее время разрядные устройства и особенно источники питания достаточно сложны и затратны. Поэтому представляет интерес исследование возможности дезинфекции жидкости с помощью разряда постоянного тока при атмосферном давлении, в котором в качестве катода используется сама дезинфицируемая жидкость, т.е. разряда с жидким неметаллическим электродом (РЖНЭ). Такой разряд очень прост в реализации, а источники постоянного тока — дешевы. Предшествующие исследования показали, что РЖНЭ с электродами из водопроводной воды в открытом воздухе устойчиво горит с током 40–100 мА при напряжении 1.5–2 кВ и генерирует влажную неравновесную НТП с высокой концентрацией химически активных радикалов NO (10^{16} – 10^{17} см⁻³), OH (10^{16} – 10^{17} см⁻³), O (10^{14} – 10^{15} см⁻³) и др. [10,11], а также такие химически активные соединения, как озон и пероксид водорода [12]. Кроме того, РЖНЭ, в отличие от разрядов в сухом воздухе [2,13], более интенсивно излучает в УФ-области спектра [14]. В настоящее время нет единого мнения о том, какие именно факторы, создаваемые электрическими разрядами (волны сжатия, УФ-излучение, продукты эрозии материала электродов) и генерируемой разрядами НТП (электрически заряженные частицы, химически активные радикалы и соединения), обуславливают антимикробный эффект [3,6]. Часто высказывается мнение о том, что антимикробный эффект является результатом синергического воздействия нескольких из перечисленных факторов.

Целью настоящего исследования являлось изучение возможности антимикробного воздействия разряда с жидким катодом при атмосферном давлении на электродную жидкость.

Эксперименты проводились на установке, схематично показанной на рисунке. В кварцевую кювету 1 (отрезок кварцевой трубки диаметром 30 мм и длиной ~ 80 мм, разрезанный пополам) подавалась суспензия микроорганизмов в водопроводной воде. Жидкость вытекала с противоположного конца кюветы. В кювету был вварен молибденовый штырь 2, служивший катодом, к кончику которого был приварен кусок никелевой фольги площадью примерно 0.5 см². Расход жидкости составлял ≈ 3 мл/с. Толщина слоя жидкости, покрывавшего катод, составляла ≈ 3–4 мм. Над поверхностью жидкости на расстоянии 4–5 мм был расположен молибденовый штырь в медной оправке, служивший анодом 3.



Схематичное изображение разрядного узла: 1 — кварцевая кювета, 2 — катод, 3 — анод, 4 — разрядная плазма, 5 — приемная емкость.

Разряд питался от источника постоянного тока, который состоял из высоковольтного трансформатора 220 V/6 kV, подключенного к сети 220 V через автотрансформатор для регулировки выходного напряжения. К вторичной обмотке трансформатора был подключен двухполупериодный выпрямитель (диодный мост). Пульсации напряжения сглаживались RC-фильтром. В цепь разряда был включен балластный резистор 10 кΩ. Ток разряда составлял ≈ 60 mA (в части экспериментов ток был увеличен до 150 mA). Напряжение между металлическими электродами составляло ≈ 1.5 kV, из которых 600–700 V падало непосредственно на разряде (в воздухе между поверхностью воды и металлическим анодом), а остальное — внутри жидкости. Фотографирование разряда позволило определить диаметр катодной привязки, который составлял ≈ 5 mm при токе 60 mA.

Кварцевая кювета, трубочка для подачи жидкости, емкость, из которой жидкость подавалась, и приемная емкость стерилизовались в автоклаве (60 min, 1 atm). Образцы микробной суспензии объемом 200 ml с определенным титром клеток при протекании через кювету

подвергались воздействию разрядом. Контрольный образец не подвергался воздействию разрядом. Время однократной обработки составляло примерно 1 min. Количество воздействий составляло от 2 до 8.

Для исключения термического воздействия в процессе эксперимента инфракрасным пирометром АК ИП-9301 определялась температура воды сразу после вытекания ее из зоны привязки разряда, а также после собирания воды в приемный резервуар. При токе 60 mA непосредственно после протекания через привязку разряда температура воды от комнатной (20–22°C) поднимается до 32–34°C. Для того чтобы при нескольких обработках не допустить значительного разогрева, приемный резервуар перед последующей обработкой охлаждался снаружи потоком воды до температуры $\approx 20\text{--}22^\circ\text{C}$.

В одной из серии измерений при исследовании каждой из культур дополнительно проводился эксперимент, в котором разряд в воздухе отсутствовал. На анод закреплялся никелевый диск, диаметр которого был равен диаметру катодной привязки РЖНЭ. Этот диск приводился в соприкосновение с водой и пропускался ток $\approx 60\text{ mA}$. Целью этих экспериментов было раздельное определение антимикробного эффекта от протекания тока в водном электроде и в воздушной части разряда.

Объектом исследования служили микроорганизмы различных таксономических групп: грамотрицательная бактериальная культура *Pseudomonas fluorescens*, грамположительная бактериальная культура *Bacillus subtilis* и дрожжеподобные грибы рода *Candida albicans*, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов. Бактерии выращивали на мясопептонном агаре (МПА) в течение суток при $28 \pm 1^\circ\text{C}$, а дрожжеподобные грибы на среде Сабуро в течение 2 суток при $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Суспензию клеток готовили на водопроводной воде. Исходный титр клеток *P. fluorescens* составлял $6.3 \cdot 10^7$ CFU/ml, *B. subtilis* — $2.4 \cdot 10^6$ CFU/ml, *C. albicans* — $1.6 \cdot 10^6$ CFU/ml. Количество клеток *P. fluorescens* и *B. subtilis* в суспензии определяли методом посева на плотную среду МПА, а *C. albicans* — на среду Сабуро в чашки Петри при разведении исходной суспензии в $10\text{--}10^7$ раз. Инкубирование посевов проводили в течение 5 суток при $28 \pm 1^\circ\text{C}$. Каждый эксперимент был выполнен с 3–5-кратным повторением с не менее чем 3 повторениями для каждого варианта эксперимента. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ

Влияние обработки РЖНЭ на жизнеспособность микроорганизмов различных таксономических групп

№ п/п	Ток, мА	Кратность обработки	Тест-культуры					
			Pseudomonas fluorescens		Candida albicans		Bacillus subtilis	
			а	б	а	б	а	б
1	0	0	$(6.3 \pm 0.7) \cdot 10^7$		$(1.6 \pm 0.2) \cdot 10^6$		$(2.4 \pm 0.3) \cdot 10^6$	
2	60	2	$(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^4$	99.98	$(9.1 \pm 0.8) \cdot 10^5$	43	$(9.6 \pm 0.7) \cdot 10^4$	96
3		4	0	100	$(4.2 \pm 0.4) \cdot 10^5$	74	$(9.6 \pm 1.0) \cdot 10^4$	96
4		8	—	—	$(4.8 \pm 0.5) \cdot 10^4$	97	$(2.4 \pm 0.2) \cdot 10^4$	99
5	150	4	—	—	$(6.4 \pm 0.6) \cdot 10^4$	96	$(2.4 \pm 0.3) \cdot 10^4$	99
7	Без разряда 60	2	$(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^6$	98	—	—	—	—
8		4	—	—	$(1.6 \pm 0.2) \cdot 10^6$	0	$(2.4 \pm 0.3) \cdot 10^6$	0

Примечание: а — количество жизнеспособных клеток, CFU/ml; б — эффективность обработки, %; „—“ не определяли.

Statistica 5.5. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

Результаты по изучению воздействия РЖНЭ на жизнеспособность микроорганизмов различных таксономических групп показали (см. таблицу), что степень антимикробного воздействия РЖНЭ зависит как от режима обработки, так и от исследуемых тест-культур. С увеличением числа воздействий током 60 мА (2–4 строки таблицы) эффективность воздействия на жизнеспособность клеток грамотрицательных бактерий *P. fluorescens* и дрожжеподобных грибов *C. albicans* возрастает. При двукратном воздействии (строка 2) на клетки *P. fluorescens* количество жизнеспособных клеток по сравнению с контролем (строка 1) снижается на 99.98%, а при четырехкратном воздействии наблюдается полное ингибирование роста (строка 3).

При двукратной, четырехкратной и восьмикратной обработке током 60 мА (строки 2–4) на дрожжеподобные клетки *C. albicans* эффективность воздействия возрастает и составляет 43, 74 и 97%

соответственно. Однако следует отметить, что в этом случае даже при восьмикратной обработке остается очень большой титр жизнеспособных клеток — $4.8 \cdot 10^4$ CFU/ml. В отличие от грамотрицательной бактериальной культуры *P. fluorescens* и дрожжеподобных грибов рода *S. albicans* эффективность воздействия током 60 мА на жизнеспособность клеток грамположительной бактериальной культуры *B. subtilis* практически не зависит от кратности воздействий и составляет от 96 до 99% (строки 2–4).

Следует отметить, что увеличение тока разряда до 150 мА при четырехкратной обработке суспензии клеток приводит к повышению эффективности воздействия только в отношении дрожжеподобных грибов *S. albicans* (строка 5). Количество жизнеспособных клеток *S. albicans* сокращается на порядок по сравнению с четырехкратной их обработкой током 60 мА (строка 3). Эффективность воздействия на грамположительную бактериальную культуру *B. subtilis* при повышении тока до 150 мА практически не увеличивается.

Четырехкратная обработка током 60 мА без разряда (т.е. при протекании тока только в воде) суспензий клеток *S. albicans* и *B. subtilis* не оказывает ингибирующего действия на их жизнеспособность (строка 8) в отличие от их четырехкратной обработки током 60 мА с разрядом (строка 3). Двукратное воздействие током 60 мА без разряда на суспензию клеток *P. fluorescens* также менее эффективно (строка 7), чем воздействие разряда (строка 2).

Полученные в работе результаты воздействия РЖНЭ на жизнеспособность клеток микроорганизмов различных таксономических групп показали, что наиболее чувствительной к данному виду обработки является грамотрицательная бактериальная культура *P. fluorescens*. Четырехкратная обработка током 60 мА суспензии клеток *P. fluorescens* обладает бактерицидным действием. Наиболее устойчивыми к воздействию РЖНЭ являются дрожжеподобные грибы *S. albicans* и грамположительная бактериальная культура *B. subtilis*. Вне зависимости от кратности обработок и величины тока данный вид воздействия обладает в отношении этих культур субингибирующим действием. Полученные результаты согласуются с данными других исследователей [15]. Авторы предполагают, что многослойная клеточная стенка грамположительных микроорганизмов обуславливает их заметно большую устойчивость к воздействию активных частиц плазмы по

сравнению с грамотрицательными микроорганизмами. Однако в некоторых случаях значительной разницы между чувствительностью грамотрицательных и грамположительных бактерий к действию НТП не выявлено [16].

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения антимикробного действия РЖНЭ. Необходимо испытать другие конструкции разрядного узла, с тем чтобы увеличить дозу УФ-излучения. Этого можно добиться, уменьшив скорость протока электродной жидкости и используя многоканальные режимы горения разряда [17].

Список литературы

- [1] *Graves D.B.* // J. Phys. D: Appl. Phys. 2012. V. 45. P. 263 001 (42 p.).
- [2] *Laroussi M.* // Plasma Process. Polym. 2005. 2. N 5. P. 391.
- [3] *Горячев В.Л., Рутберг Ф.Г., Уфимцев А.А.* // Письма в ЖТФ. 1998. Т. 24. В. 3. С. 91.
- [4] *Коликов В.А., Курочкин В.Е., Панина Л.К.* и др. // ЖТФ. 2007. Т. 77. В. 2. С. 118.
- [5] *Anpilov A.M., Barkhudarov E.M., Bark Yu.B.* et al. // J. Phys. D: Appl. Phys. 2001. V. 34. N 6. P. 993.
- [6] *Akichev Yu., Grushin M., Karalnik V.* et al. // Pure Appl. Chem. 2008. V. 80. P. 1953.
- [7] *Du C.M., Wang J., Zhang L., Li H.X.* et al. // New J. Phys. 2012. V. 14. P. 013 010 (16 p.).
- [8] *Трофимова С.В., Иванова И.П., Бугрова М.Л.* // Мед. альманах. 2013. № 3 (27). С. 87.
- [9] Plasma assisted decontamination of biological and chemical agents. Ed. by Gusev S., Friedman A. Springer, 2008. 1. P. 21.
- [10] *Andre P., Barinov Y.A., Faure G., Shkol'nik S.M.* // J. Phys. D: Appl. Phys. 2011. V. 44. P. 375 202.
- [11] *Andre P., Barinov Y.A., Faure G., Shkol'nik S.M.* // J. Phys. D: Appl. Phys. 2011. V. 44. P. 375 203.
- [12] *Титова Ю.В., Сергеева И.Н., Кузьмичева Л.А., Максимов А.И.* // Синтез пероксида водорода в растворе электролита под действием разрядов атмосферного давления. III ISTARС. Плес, 2002. Т. 1. С. 103.
- [13] *Boudam M.K., Moisan M., Saoudi B.* et al. // J. Phys. D: Appl. Phys. 2006. V. 39. P. 3494.

- [14] *Баринов Ю.А., Каплан В.Б., Школьник С.М.* Исследование ультрафиолетовой области спектра излучения разряда с жидкими неметаллическими электродами в воздухе при атмосферном давлении. ФНТП-2004. Петрозаводск, 2004. Т. 1. С. 198.
- [15] *Кобзев Е.Н., Киреев Г.В., Ракицкий Ю.А.* и др. // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 49. № 2. С. 164.
- [16] *Critzer F.J., Kelly-Wintenberg K., South S.L., Golden D.A.* // J. Food Protection. 2007. V. 70 (10). P. 2290.
- [17] *Баринов Ю.А., Каплан В.Б., Школьник С.М.* // Разряд с жидким неметаллическим катодом и его воздействие на загрязнения катодной жидкости нефтепродуктами. IV ISTARС. Иваново, 2005. С. 477.