

环境工程学报
Chinese Journal of
Environmental Engineering

第17卷第12期2023年12月

Vol. 17, No.12 Dec. 2023

http://www.cjee.ac.cn

🕋 (010) 62941074

A

文章栏目:水污染防治

DOI 10.12030/j.cjee.202306077 中图分类号 X703 文献标识码

陈纪朝, 陈镇斌, 曹礼三, 等. 紫外/过氧乙酸灭活大肠杆菌的效能及机理[J]. 环境工程学报, 2023, 17(12): 4037-4047. [CHEN Jizhao, CHEN Zhenbin, CAO Lisan, et al. Inactivation of *Escherichia coli* by peracetic acid combined with ultraviolet: Efficiency and mechanism[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2023, 17(12): 4037-4047.]

紫外/过氧乙酸灭活大肠杆菌的效能及机理

陈纪朝¹,陈镇斌¹,曹礼三¹,成宇杰¹,岳思阳²,王宗平¹,谢鹏超^{1,∞} 1.华中科技大学环境科学与工程学院,武汉 430074; 2.华中科技大学建筑与城市规划学院,武汉 430074

摘 要病原微生物对公共卫生及生态系统产生了极大威胁,为研究紫外/过氧乙酸体系 (UV/PAA)的消毒效能,以大肠杆菌为目标微生物,考察了 PAA 和 UV 投加剂量、不同背景物质对大肠杆菌灭活的影响,检测了体系中生成的活性物种并观察了反应过程中细胞形态变化。结果表明:在 PAA 浓度为 60 µmol·L¹和 UV 光强为 2.25×10⁻⁷ Einstein·(s·L)⁻¹的条件下反应 3 min 后,大肠杆菌的灭活率能达到 4.71 log,相较单独 PAA 体系和单独 UV 体系分别提高了 2.76 log和 0.82 log,且灭活率随 PAA 浓度和 UV 辐射剂量增加而提高。NH₄⁺和 CI 对于 UV/PAA 体系灭活大肠杆菌有轻微的抑制作用,而腐殖酸 (HA) 对于体系有较强的抑制作用。自由基淬灭实验和电子顺磁共振检测结果表明,UV/PAA 体系 灭活大肠杆菌的主要活性物质为羟基自由基 (HO·)和有机自由基 (RO·)。激光共聚焦显微镜和扫描电子显微镜观察的结果表明,UV/PAA 体系灭活大肠杆菌时,会引起细胞膜轻微破损,但并不会导致严重的裂解。反应溶液中溶解性成分的荧光光谱分析表明大肠杆菌灭活时释放的有机物会随着细胞膜破损而增加,但释放的类蛋白大分子物质最终可被氧化为类腐殖酸小分子有机物。

关键词 紫外线; 过氧乙酸; 大肠杆菌; 消毒; 自由基

病原微生物经市政污水及合流制溢流进入地表水体,对公共卫生及生态系统产生了极大威胁^[1]。目前应 用最广泛的消毒方法为氯消毒、臭氧消毒和紫外消毒。氯消毒应用成本低且消毒效率高,但其消毒过程中产 生的卤代消毒副产物具有较强毒性;臭氧消毒效率高,接触时间短,但制备成本较高,且无持续消毒作用; 紫外线主要通过破坏细胞内遗传物质 (DNA 和 RNA) 抑制微生物繁殖^[2],消毒效率高,但在消毒过程中存在 拖尾现象^[3]、消毒效果易受水质影响且存在一定的光复活风险^[4-7]。因此寻找绿色、高效的消毒方法意义 重大。

过氧乙酸 (peracetic acid, CH₃C(O)OOH), 简称 PAA, 是一种新兴氧化剂, 相比于传统消毒剂具有较强的氧化性, 其氧化还原电位 (E_0 = 1.96 eV) 高于过氧化氢 (E_0 =1.8 eV)、氯 (E_0 =1.4 eV)及二氧化氯 (E_0 = 1.5 eV), 且在消毒过程中产生的消毒副产物较少^[2,8]。PAA 最早于 20 世纪初应用于食品工业中^[9], 近年来欧美国家将其用于市政污水和雨水消毒^[1,10-11],其在灭活细菌、真菌及芽孢时有较好效果^[12-13]。PAA 通过扩散作用从细胞膜渗透进入细胞,氧化细胞内的蛋白质和酶从而使细胞失活,而这种氧化灭活作用通常较弱^[14-15], 且无法消除病原菌中的抗生素的抗性基因^[16]。

紫外活化 PAA(UV/PAA) 体系是一种新兴高级氧化体系,PAA 被 UV 活化后可产生羟基自由基 (HO·)、有机自由基 (CH₃C(O)O·, CH₃C(O)OO·)、超氧自由基 (O₂⁻) 和单线态氧 (¹O₂) 等活性物质^[17]。目前 该体系广泛应用于水中微污染物去除^[18],体系中的 UV 辐照、PAA 及 UV 活化 PAA 产生的自由基均具有较 好的消毒潜力^[19-20]。相较于单独 PAA 体系,UV/PAA 体系能够显著提高灭活效率,相较单独 UV 体系,UV/PAA 体系能改善拖尾现象,快速实现高灭活率,且体系内自由基对细胞膜造成的破坏能够限制微生物的 自我修复^[6],降低复活风险,具有广阔的应用前景。但目前对于应用 UV/PAA 体系消毒时工艺参数和背景物

收稿日期: 2023-06-17; 录用日期: 2023-09-23

第一作者:陈纪朝 (1999—),男,硕士研究生,1982055971@qq.com; ⊠通信作者:谢鹏超 (1987—),男,博士,教授, xiepengchao555@163.com

大肠杆菌是常见的病原微生物,也是水质分析中常用的指标菌^[21]。故本研究选取大肠杆菌作为目标微生 物、考察了 UV/PAA 体系中工艺、水质参数对大肠杆菌灭活效率的影响,并探究了其灭活机理,以期为深度 理解 UV/PAA 体系消毒机制及其应用潜力提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

主要试剂: 过氧乙酸由乙酸和过氧化氢在浓硫酸催化下制备^[22]; 过氧化氢、浓硫酸、叔丁醇 (TBA)、己 二烯 (2.4-HD)、氯化钠、硫酸铵、磷酸一氢钠、磷酸氢二钠、牛肉浸膏、蛋白胨、琼脂粉购自国药集团化学 试剂有限公司; 5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物 (DMPO)、腐殖酸购自阿拉丁试剂有限公司; Calcein-AM/PI 试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;实验室所用试剂均采用超纯水 (18.2 MΩ·cm) 配置。

实验装置:本实验采用准平行紫外光反应装 置。如图1所示,在避光箱体内安装1根波长 254 nm 功率为 5 W 的紫外灯管 (GPH135T5L/4, Heraeus,德国),紫外光透过避光套管照射到反应 器上,套管底部装有凸透镜产生准平行紫外光。反 应器和磁力搅拌器置于伸缩工作台上,其高度可以 调节,反应溶液中的紫外光强由 KI/KIO, 化学光 度计法测定[23]。

1.2 实验步骤

1) 磷酸盐缓冲液配置。称量 2.864 g 磷酸-氢钠和 0.312 g 磷酸氢二钠溶于 1 000 mL 超纯水 中配置成浓度为 0.01 mol·L⁻¹、pH=7.5 的磷酸盐 缓冲液。所有灭活实验在磷酸盐缓冲液中进行, 经 测定反应过程中溶液中 pH 稳定在 7.5±0.1。

2) 菌液配制。配置 LB(Luria-Bertani) 液体培 养基 (10 g·L⁻¹ 蛋白胨, 3 g·L⁻¹ 牛肉浸膏, 5 g·L⁻¹



图 1 平行紫外光反应装置示意图

Fig. 1 Schematic diagram of parallel ultraviolet reactor

氯化钠), 经高压灭菌锅灭菌 20 min 后冷却至室温接种大肠杆菌, 放入 37 ℃ 振荡培养箱中以 150 r·min⁻¹转 速振荡培养 18~20 h, 随后离心分离 (3 500 r·min⁻¹, 15 min), 用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次, 洗涤后的菌体重悬 于磷酸盐缓冲液中备用。

3) 大肠杆菌灭活实验。在反应器内取菌液和磷酸盐缓冲液中配制成 40 mL 的反应溶液,溶液中大肠杆 菌初始浓度为 1×10⁷~2×10⁷ CFU·mL⁻¹,配置完成后在磁力搅拌器转速 800 r·min⁻¹ 下搅拌使溶液中大肠杆菌 充分分散。

进行灭活实验时,提前 20 min 预热紫外灯管,控制室温 (25±1) ℃,反应开始时向反应器中加入 PAA, 拉开伸缩隔板使紫外光照射在反应器表面, 分别在反应时间 0、1、2、3 min 时取样 200 µL, 取样后 立刻向样品中加入 5 µL 0.5 mol·L⁻¹ 硫代硫酸钠溶液中止反应。采用平板计数法对于样品溶液中大肠杆菌进 行计数,每组实验至少重复2次。

1.3 分析方法

▼1) 氧化剂浓度测定。制备的 PAA 原液中含有 PAA 和 H₂O₂,采用碘量法测定总过氧化物的浓度。在酸 性 pH 条件下,用高锰酸钾滴定法测定原液中 H₂O2 的浓度。PAA 浓度用总过氧化物的浓度减去 H₂O2 的浓 度计算^[22]。经测定,本实验中使用的 PAA 原液中 PAA 浓度为 1.14 mol·L⁻¹,H₂O,浓度为 0.68 mol·L⁻¹。

2) 大肠杆菌平板计数。样品经过梯度稀释后进行涂布平板计数,取样 100 µL 均匀涂布在 LB 固体培养 基 (蛋白胨 10 g·L⁻¹, 牛肉浸膏 3 g·L⁻¹, 氯化钠 5 g·L⁻¹, 琼脂 20 g·L⁻¹)上, 放入 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后计数。

3) 大肠杆菌灭活率。用对数去除率表示大肠杆菌灭活率,可由式(1)进行计算。

$$n = -\log\frac{N}{N_0} \tag{1}$$

式中: n 为对数去除率, N 和 N_0 为灭活后和灭活前的样品菌落数, CFU·mL⁻¹。

4) 活性物种表征。利用电子顺磁共振技术 (EPR) 检测体系内可能的活性物种,取1mL 反应溶液,向其中加入 50 mmoL·L⁻¹ DMPO 捕获产生的自由基,利用电子顺磁共振光谱仪 (EMX nano, Bruker,德国) 检测 DMPO 加合物信号。

5) 细胞膜完整性表征。使用 Calcein-AM/PI 试剂盒染色在激光共聚焦显微镜 (TCS-SP8, Leica, 德国) 下观察大肠杆菌细胞膜完整性。取反应后的样品 0.5 mL,加入 Calcein-AM 原液 1 μL,避光染色 20 min,再加入 PI 原液 4 μL 避光染色 5 min,染色后细胞用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,置于激光共聚焦显微镜下检测荧光。Calcein-AM 染料采用 488 nm 激发波长,检测 498~550 nm 发射波长,PI 染料采用的激发波长为 552 nm,发射波长为 562~650 nm^[24]。

6) 细胞表面形态表征。收集反应后溶液,经过量硫代硫酸钠中止反应并离心去除上清液,使用磷酸盐缓 冲液洗涤 2~3 次后,收集离心管底部菌体真空冷冻干燥 24 h 后,在扫描电子显微镜 (IT200, JSM,日本)下 观察大肠杆菌表面形态。

7) 荧光光谱分析。取反应后溶液,经过量硫代硫酸钠中止反应后使用 0.22 μm 滤头过滤,采用荧光光谱 仪 (F-7100, Hitachi,日本)检测反应过程中大肠杆菌悬液中溶解性成分的变化。检测的激发波长 200~ 450 nm,发射波长 280~550 nm。使用荧光体积积分的方法分析测定的荧光激发-发射光谱。将图谱分为 5 个 区域,每个区域代表—大类物质^[25],如下表 1 所示。对 5 个区域分别进行荧光体积积分,积分数值能够定量 反映该区域总体荧光强度。

Table 1 Representative components in each region by fluorescence regional integration method				
荧光区域	物质种类	激发波长(Ex)和发射波长(Em)/nm	代表性物质	
Ι	芳香类蛋白类物质I	Ex<250, Em<330	酪氨酸	
П	芳香类蛋白类物质Ⅱ	Ex<250, 330 <em <380<="" td=""><td>色氨酸</td>	色氨酸	
Ш	类富里酸物质	Ex<250, Em>380	富里酸	
IV	溶解性微生物代谢产物	Ex>250, Em<380	蛋白质	
V	类腐殖酸物质	Ex>250, Em>380	腐殖酸	

表1 荧光体积积分法各区域代表物质

2 结果与分析

2.1 不同体系下大肠杆菌的灭活率

在初始大肠杆菌浓度 1×10⁷~2×10⁷ CFU·mL⁻¹, PAA 浓度 60 µmol·L⁻¹(含 36 µmol·L⁻¹ H₂O₂), H₂O₂ 浓

度96µmol·L⁻¹,紫外光强2.25×10⁻⁷Einstein·(s·L)⁻¹,反应时间3min的条件下,考查了PAA、UV、UV/PAA、UV/H₂O₂4种体系下大肠杆菌的灭活率。实验结果如图2所示,单独PAA对大肠杆菌的灭活率为1.95 log,说明单独PAA的对于大肠杆菌的氧化灭活能力较弱^[14-15];紫外线通过破坏细胞内遗传物质能够有效地实现大肠杆菌灭活,因此单独UV对于大肠杆菌的灭活率可以达到3.89 log^[2];而UV/PAA体系的大肠杆菌灭活率达到了4.71 log,相较于UV体系提升了0.82 log,说明紫外活化PAA能够有效提升大肠杆菌灭活率,这可能是由于体系中产生了大量自由基,这些自由基具有较高的氧化还原电位,对于微生物的细胞膜/壁、





Fig. 2 Inactivation rate of E. coli in different processes

酶和遗传物质都有破坏作用^[26]。由于本实验使用的 PAA 中含有一定量 H_2O_2 ,为探究共存 H_2O_2 对于大肠杆 菌的灭活影响,在 UV 体系中加入与 UV/PAA 体系等过氧化物浓度的 $H_2O_2(96 \ \mu mol \cdot L^{-1})$,实验结果表明 UV/ H_2O_2 体系的灭活率仅为 3.12 log,低于单独 UV 体系的 3.89 log,说明共存 H_2O_2 对于 UV/PAA 体系灭 活效率影响可以忽略不计,这与之前的研究结果是一致的^[27]。

2.2 工艺参数影响

1) 紫外辐射剂量影响。在大肠杆菌浓度 1×10⁷~2×10⁷ CFU·mL⁻¹,紫外光强 2.25×10⁻⁷ Einstein·(s·L)⁻¹ 的条件下改变紫外照射时间探究紫外辐射剂量对于大肠杆菌灭活的影响,2~8 min 的紫外辐照时间分别对应

8~32 mJ·cm⁻² 的紫外辐射剂量,结果如图 3 所示。紫外辐射剂量为 8 mJ·cm⁻² 时,大肠杆菌灭活率可达到 2.76 log,随着紫外辐射剂量由 8 mJ·cm⁻²提升至 16 mJ·cm⁻²,灭活率提升了 1.25 log,达 到 4.01 log,而紫外辐射剂量由 16 mJ·cm⁻²提升 至 32 mJ·cm⁻²,灭活率仅提升了 0.75 log,达到 4.76 log。上述结果说明紫外线照射能够实现大肠 杆菌的快速灭活,但持续增加紫外线辐射剂量时灭 活过程会出现一定的拖尾现象,可能与细胞聚集有 关^[3]。拖尾现象导致紫外消毒效率大幅受限,增加 使用成本,单独紫外照射 8 min 的灭活率 4.76 log 与 UV/PAA 体系反应 3 min 的灭活率 4.76 log 基本相同。为避开紫外作用拖尾段,提高消毒效率, 本实验选择时间为 3 min,对应紫外辐射剂量为 12 mJ·cm⁻²。

2) 过氧乙酸浓度影响。在大肠杆菌浓度 1×10⁷~2×10⁷ CFU·mL⁻¹、紫外光强 2.25×10⁻⁷ Einstein·(s·L)⁻¹、反应时间 3 min 的条件下探究 PAA 浓度对于体系灭活率影响,结果如图 4 所 示。当PAA 浓度由 30 µmol·L⁻¹ 提升至 90 µmol·L⁻¹ 时,大肠杆菌灭活率相应由 3.92 log 提升至 5.02 log,而当溶液中 PAA 浓度提升至 120 µmol·L⁻¹ 时仅需 2 min 就可以达到 5.96 log 的灭活率。说明 提升溶液中的 PAA 浓度能够提高大肠杆菌灭活 率,原因可能为 PAA 浓度增加时不仅可以增加扩 散至大肠杆菌内的 PAA 浓度,而且可以产生更多 的自由基,增强对于细胞膜结构及胞内物质的破 坏^[26]。综合考虑灭活效果及氧化剂使用成本,本实 验采用的 PAA 浓度为 60 µmol·L⁻¹。



Fig. 4 Influence of PAA concentration on inactivation rate of *E. coli*

2.3 背景物质影响

UV/PAA 体系常用于地表污废水的消毒^[28]。氨氮 (NH₄⁺)、盐度 (Cl⁻)、及腐殖质 (HA) 为污废水常见水 质指标,需考虑这些背景物质对于 UV/PAA 消毒效能的影响,其在地表水消毒中的常见质量浓度分别 为^[29-31]: 0~15 mg·L⁻¹ NH₄⁺、20~100 mg·L⁻¹ Cl⁻、0~10 mg·L⁻¹ HA。为深入探究背景物质浓度影响,本实验 中所选背景物质浓度均大于等于常见浓度。

1) NH_4^+ 影响。 NH_4^+ 对于 UV/PAA 体系的影响如图 5 所示,溶液中 NH_4^+ 质量浓度从 0 mg·L⁻¹ 提升至 30 mg·L⁻¹ 时,大肠杆菌灭活率仅仅降低了 0.52 log。由于所选的 NH_4^+ 浓度范围已远大于地表水中常见的浓度,故 NH_4^+ 对于 UV/PAA 体系灭活大肠杆菌效果无显著影响。

2) CI-影响。CI-对于 UV/PAA 体系的影响如图 6 所示。溶液中 CI-质量浓度从 0 提升至 100





Fig. 5 Influence of NH_4^+ concentration on inactivation rate of *E. coli*

mg·L⁻¹时,大肠杆菌灭活率从 4.71 log 降至 3.89 log。Cl⁻可以与体系中的自由基反应进而生成 Cl·和 Cl₂⁻等活性氯化物,虽然这些活性氯化物也 具有一定氧化性,但其不仅会发生自分解反应^[32-33], 且灭活病原微生物的效率低于 HO·和 RO·,因 此,氯离子表现出抑制 UV/PAA 体系的灭活效率。

3) HA 影响。HA 对于 UV/PAA 体系灭活大 肠杆菌的影响如图 7 所示。当溶液中 HA 质量浓度由 0 提升至 20 mg·L⁻¹ 时,大肠杆菌灭活率由 4.71 log 降至 2.36 log,说明 HA 对于 UV/PAA 体系的灭活效果产生了显著的抑制作用。主要原因是 HA 能够淬灭 HO·和 RO·^[34-35],其对应的反应速率常数分别为 2.5×10⁴ L·(mg·s)⁻¹和 5.76×10⁴ L·(mg·s)⁻¹,进而导致体系中与大肠杆菌作用的自由基减少,最终导致大肠杆菌灭活率下降。







2.4 大肠杆菌灭活机理探究

1)活性物种鉴定。现有研究表明 UV/PAA 体系中主要的活性物种为 HO·和 RO^{-[17]},为探究 UV/PAA 体系灭活大肠杆菌中主要作用的活性物种,采用了淬灭实验和 EPR 检测两种方式对于体系内的自由基进行了种类鉴定并分析了其贡献。

本实验采用叔丁醇 (TBA) 和己二烯 (2,4-HD)2 种物质作为淬灭剂,其中叔丁醇与 HO·反应活性较高 (*k*=6×10⁸L·(mol s)⁻¹),用作于 HO·的淬灭剂,而2,4-HD 与HO·(*k*=1×10¹⁰L·(mol s)⁻¹)和RO·(*k*>5×10⁸L·(mol s)⁻¹) 均有着很高的反应活性,用作于 HO·和 RO·的淬灭剂^[17]。反应溶液中 TBA 和 2,4-HD 的浓度为 1 mmol·L⁻¹,远高于 PAA 的浓度 (60 μmol·L⁻¹),可认为反应中自由基被完全淬灭^[13,36]。

如图 8(a) 所示,分别加入 2 种淬灭剂后,UV/PAA 体系对大肠杆菌的灭活率均有所下降。其中加入 TBA 淬灭 HO·后体系灭活率降至 3.60 log,加入 2,4-HD 淬灭 HO·及 RO·后体系灭活率降至 3.23 log,相比 不加入淬灭剂时分别降低了 1.11 log 和 1.48 log。以上结果表明体系内的 HO·和 RO·均对大肠杆菌灭活有 贡献。

为更直观鉴定体系内自由基种类,采用 DMPO 作为捕获剂,利用 EPR 检测体系内自由基与 DMPO 的加合物。单独 UV 体系中一般不产生高浓度自由基^[37],故本实验中检测了 PAA、UV/PAA、UV/PAA/2,4-HD 体系中产生的自由基加合物,结果如图 8(b) 所示。UV/PAA 体系中出现了 HO·和 DMPO 加合物的特征峰,而在 PAA 和 UV/PAA/2,4-HD 体系中无特征峰信号。说明单独 PAA 体系中不会产生自由基。UV 活化



图 8 淬灭剂对于大肠杆菌灭活率影响及不同体系的 EPR 谱图

Fig. 8 Influence of quenchers on inactivation rate of E. coli and EPR spectra of different processes

PAA 能够产生 HO·,这与加入 TBA 淬灭 HO·后体系灭活率下降的结果一致,表明 HO·参与大肠杆菌的灭活。RO·无法直接检测到,可能的原因是由于体系内 RO·稳态浓度较低且不稳定会进一步反应生成二级自由基,难以通过 DMPO 直接捕获,AO 等^[38] 也发现类似的结果。但加入 2,4-HD 淬灭 HO·和 RO·后体系灭活率较加入 TBA(淬灭 HO·)后降低更明显,可从侧面说明 RO·也参与了大肠杆菌灭活,且体系生成的 HO·也可与 PAA 进一步反应生成 RO^[39],体系中能直接检测到 HO·表明有 RO·共存。以上结果表明 UV/PAA 体系中 HO·和 RO·对大肠杆菌灭活均有贡献。

2) 细胞膜完整性鉴定。为判断反应过程中大肠杆菌细胞膜完整性,采用 Calcein-AM/PI 两种荧光染料对 处理前后的大肠杆菌进行染色后在激光共聚焦显微镜下观察荧光,其具体原理如下: Calcein-AM 染料能穿透 活细胞的细胞膜,与活细胞内的酯酶反应形成非渗透性分子 Calcein,滞留细胞内发出绿色荧光,用于表征细 胞膜完整的活细胞; PI 染料能穿透细胞膜破损区域,与细胞 DNA 结合发出红色荧光,用于表征细胞膜破损 的细胞,二者共同染色能对同时细胞膜完整和破损的细胞进行标记。激光共聚焦显微镜下观察显示绿色荧光 的为细胞膜完整的细胞,显示红色荧光的为细胞膜破损的细胞,观察结果如图 9 所示。



注:分图(a)~(d)代表Calcein-AM染料(分图名中简写为AM)的绿色荧光(标记细胞膜完整的细胞); 分图(e)~(h)代表PI染料的红色荧光(标记细胞膜破损的细胞)。

图 9 UV/PAA 体系中大肠杆菌的激光共聚焦显微镜图

Fig. 9 Confocal fluorescence images of E. coli treated by UV/PAA process

结果表明,反应开始时,所有细胞均能维持其细胞膜完整性,反应时间 3 min 时仅有少量细胞细胞膜破损,而灭活实验结果表明此时溶液内几乎所有大肠杆菌均能被灭活,这与电化学/过氧乙酸和超声/过氧乙酸等体系中的现象不同^[36,40]。为探究体系内大肠杆菌细胞灭活原因是否为细胞膜完整性被破坏,对反应时间 10 min 和 20 min 时大肠杆菌的细胞膜完整性进行了表征,此时的大肠杆菌可认为被完全灭活。结果表明即 使反应时间延长至 10 min 也仅有少量细胞细胞膜破坏,反应时间 20 min 时虽然细胞膜破损的细胞数量有所 增加但仍有大部分细胞能维持其细胞膜完整性。上述结果说明紫外/过氧乙酸体系灭活大肠杆菌并不以破坏其 细胞完整性为主要机制,而反应过程中造成的细胞膜破坏可能是来自于自由基对于细胞膜中脂质的攻击^[25]。包括大肠杆菌在内的部分微生物经灭活后不能在培养基上培养繁殖,但仍能保持一定活性和细胞膜完整性,被称为 VBNC(viable but non-culturable) 状态^[41],结合实验结果说明本实验中部分大肠杆菌经灭活后会进入 VBNC 状态,虽然不能在固体培养基上培养,但仍保持一定的细胞活性和细胞膜完整性。

3) 细胞表面形态鉴定。为进一步探究反应过程中大肠杆菌表面形态的变化,采用扫描电子显微镜拍摄了 反应时间 0、3、10、20 min 时大肠杆菌表面形态,分别如图 10(a)~(d) 所示。扫描电镜图片显示,反应时间 0 min 时大肠杆菌细胞膜表面光滑,菌体饱满呈杆状;反应时间 3 min 时大部分大肠杆菌仍能保持原始饱满 形态,少部分大肠杆菌细胞膜皱缩变形,个别大肠杆菌细胞膜出现破损;反应时间 10 min 时绝大部分大肠杆 菌菌体变形,细胞膜出现皱缩,少量大肠杆菌细胞膜出现破损;反应时间 20 min 时细胞变形和细胞膜皱缩的 程度更强,细胞膜出现破损的细胞数量继续增加。随着反应时间延长,变形破损的细胞数量逐渐增加,与激 光共聚焦显微镜中观察到 PI 染料红色荧光随反应延长而增加的现象相对应。但破损的大肠杆菌细胞未完全裂 解为碎片,说明 UV/PAA 体系能够对细胞膜结构造成一定损伤,但无法使大肠杆菌完全裂解,这与激光共聚 焦显微镜表征得到的结论一致。



(a) 0 min大肠杆菌表面形态

(b) 3 min大肠杆菌表面形态



(c) 10 min大肠杆菌表面形态(d) 20 min大肠杆菌表面形态注:为突出大肠杆菌细胞表面形态的变化,图中部分变形和破损的细胞由红色箭头指出示意。

图 10 UV/PAA 体系中大肠杆菌的扫描电子显微镜图

Fig. 10 Scanning electron microscope images of E. coli treated by UV/PAA process

4) 荧光光谱特性变化。通过荧光光谱分析溶液中大肠杆菌细胞有机物释放,如下图 11 所示,其中图 11(a)~(e) 分别为反应溶液分别在 0、3、5、10、20 min 的荧光光谱,图 11(f) 为各反应时间荧光光谱的分



Fig. 11 Fluorescence spectra of filtered *E-coli* solution at different reaction times in UV/PAA process and variation of fluorescence regional integration values during reaction

区荧光体积积分。由图 11(a) 可以看出,反应溶液的荧光光谱在Ⅳ区有较强的荧光峰,说明溶液中主要的有 机物为溶解性微生物代谢产物;反应 3 min 后的溶液中Ⅳ区荧光强度相较于 0 min 降低了 28.1%,说明大量 溶解性微生物代谢产物被降解,原因可能为自由基与硫基团有着较强的反应活性,优先氧化降解类蛋白物 质^[15];反应 5 min 后Ⅳ区荧光强度较 3 min 上升了 5.7%,可能为反应过程中大肠杆菌细胞破损导致胞内物质 的释放;当反应时间延续至 10 min 和 20 min 时,Ⅳ区荧光强度持续增强,说明大肠杆菌细胞膜结构被破坏 导致胞内有机物释放,Ⅲ区和Ⅴ区内荧光强度在反应 20 min 后显著增强,相较 5 min 时分别增加了 43.3% 和 204.4%, 说明在氧化活性物质作用下溶液中类蛋白大分子有机物向类腐殖酸和类富里酸等小分子类 有机物转变^[42]。反应 20 min 后,总荧光峰强度呈现先降后升的趋势,表明大肠杆菌释放的有机物先被迅速 氧化降解,之后随大肠杆菌细胞膜结构破坏进而释放有机物,释放的大分子类蛋白有机物可被进一步氧化降 解为小分子有机物。

3 结论

1) UV/PAA 体系能实现大肠杆菌高效灭活,在 PAA 浓度 60 μ mol·L⁻¹ 和紫外光强 2.25×10⁻⁷ Einstein·(s·L)⁻¹ 的条件下反应 3 min 达到 4.71 log 灭活率,且灭活率随过氧乙酸浓度和紫外线剂量增加而提高。

2) NH₄⁺和 CI 对于 UV/PAA 体系灭活大肠杆菌有轻微的抑制作用,而 HA 对于 UV/PAA 体系灭活大肠 杆菌产生明显的抑制作用。

3) 在 UV/PAA 体系灭活大肠杆菌中起主要作用的自由基包括 HO·和 RO·

4) UV/PAA 体系灭活大肠杆菌过程能够对其细胞膜产生损伤,但不能使其细胞完全裂解,胞内有机物 随细胞膜破损而释放,大分子类蛋白有机物最终被氧化为小分子类腐殖酸有机物。

参考文献

- [1] CHHETRI R K, BONNERUP A, ANDERSEN H R. Combined sewer overflow pretreatment with chemical coagulation and a particle settler for improved peracetic acid disinfection [J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2016, 37: 372-379.
- [2] HASSABALLAH A H, BHATT T, NYITRAI J, et al. Inactivation of *E. coli, Enterococcus spp.*, somatic coliphage, and *Cryptosporidium parvum* in wastewater by peracetic acid (PAA), sodium hypochlorite, and combined PAA-ultraviolet disinfection[J]. Environmental Science Water Research & Technology, 2020, 6, 197.
- [3] VITZILAIOU E, KURIA A M, SIEGUMFELDT H, et al. The impact of bacterial cell aggregation on UV inactivation kinetics [J]. Water Research, 2021, 204: 117593.
- [4] LIU S, QU H, YANG D, et al. Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant[J]. Water Research, 2018, 136: 131-136.
- [5] RAJAB M, HEIM C, LETZEL T, et al. Electrochemical disinfection using boron-doped diamond electrode–The synergetic effects of in situ ozone and free chlorine generation [J]. Chemosphere, 2015, 121: 47-53.
- [6] SUN P, ZHANG T, MEJIA-TICKNER B, et al. Rapid disinfection by peracetic acid combined with UV irradiation [J]. Environmental Science & Technology Letters, 2018, 5(6): 400-404.
- [7] LI G, WANG W, HUO Z, et al. Comparison of UV-LED and low pressure UV for water disinfection: Photoreactivation and dark repair of *Escherichia* coli[J]. Water Research,2017, 126: 134-143.
- [8] LUUKKONEN T, PEHKONEN S O. Peracids in water treatment: A critical review [J]. Critical Reviews in Environmental Science and Technology,2017, 47(1): 1-39.
- [9] FRAISE A P, MAILLARD J-Y, SATTAR S A. Russell, Hugo & Ayliffe's principles and practice of disinfection preservation and sterilization [M]. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013.
- [10] MANOLI K, SARATHY S, MAFFETTONE R, et al. Detailed modeling and advanced control for chemical disinfection of secondary effluent wastewater by peracetic acid[J]. Water Research, 2019, 153: 251-262.
- [11] KOIVUNEN J, HEINONEN-TANSKI H. Peracetic acid (PAA) disinfection of primary, secondary and tertiary treated municipal wastewaters[J]. Water Research, 2005, 39(18): 4445-4453.
- [12] STRAUS D L, MEINELT T, FARMER B D, et al. Peracetic acid is effective for controlling fungus on channel catfish eggs[J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35(7): 505-511.
- [13] LIN W, ZUO J, LI K, et al. Pre-exposure of peracetic acid enhances its subsequent combination with ultraviolet for the inactivation of fungal spores: Efficiency, mechanisms, and implications [J]. Water Research, 2023, 229: 119404.
- [14] LEAPER S. Synergistic killing of spores of *Bacillus subtilis* by peracetic acid and alcohol[J]. International Journal of Food Science & Technology, 1984, 19(3): 355-360.
- [15] MCFADDEN M, LOCONSOLE J, SCHOCKLING A J, et al. Comparing peracetic acid and hypochlorite for disinfection of combined sewer overflows: Effects of suspended-solids and pH[J]. Science of the Total Environment, 2017, 599-600: 533-539.
- [16] TUROLLA A, SABATINO R, FONTANETO D, et al. Defence strategies and antibiotic resistance gene abundance in *enterococci* under stress by exposure to low doses of peracetic acid[J]. Chemosphere, 2017, 185: 480-488.
- [17] ZHANG T, HUANG C. Modeling the kinetics of UV/peracetic acid advanced oxidation process[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(12): 7579-7590.
- [18] HOLLMAN J, DOMINIC J A, ACHARI G. Degradation of pharmaceutical mixtures in aqueous solutions using UV/peracetic acid process: Kinetics, degradation pathways and comparison with UV/H₂O₅[J]. Chemosphere, 2020, 248: 125911.
- [19] PARK E, LEE C, BISESI M, et al. Efficiency of peracetic acid in inactivating bacteria, viruses, and spores in water determined with ATP bioluminescence, quantitative PCR, and culture-based methods [J]. Journal of Water and Health. 2014, 12(1): 13-23.
- [20] BEBER DE SOUZA J, QUEIROZ V F, JERANOSKI R F, et al. Water and wastewater disinfection with peracetic acid and UV radiation and using advanced

oxidative process PAA/UV[J]. International Journal of Photoenergy, 2015, 2015: 1-7.

- [21] VINET L, ZHEDANOV A. A'missing'family of classical orthogonal polynomials[J]. Journal of Physics A: Mathematical and Theoretical, 2011, 44(8): 85201.
- [22] WANG Z, WANG J, XIONG B, et al. Application of cobalt/peracetic acid to degrade sulfamethoxazole at neutral condition: Efficiency and mechanisms[J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54(1): 464-475.
- [23] RAHN R O. Potassium iodide as a chemical actinometer for 254 nm radiation: Use of iodate as an electron scavenger[J]. Photochemistry and Photobiology, 1997, 66(4): 450-455.
- [24] LIN Q S, DONG X L, XI S H, et al. Optimizing waste activated sludge disintegration by investigating multiple electrochemical pretreatment conditions: Performance, mechanism and modeling [J]. Science of the Total Environment, 2023, 870: 162025.
- [25] WAN Y, XIE P, WANG Z, et al. Comparative study on the pretreatment of algae-laden water by UV/persulfate, UV/chlorine, and UV/H₂O₂: Variation of characteristics and alleviation of ultrafiltration membrane fouling[J]. Water Research, 2019, 158: 213-226.
- [26] BAI M, TIAN Y, YU Y, et al. Application of a hydroxyl-radical-based disinfection system for ballast water [J]. Chemosphere, 2018, 208: 541-549.
- [27] 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.
- [28] LUUKKONEN T, HEYNINCK T, RÄMÖ J, et al. Comparison of organic peracids in wastewater treatment: Disinfection, oxidation and corrosion[J]. Water Research. 2015, 85: 275-285.
- [29] 杨敏,尚巍,李鹏峰,等.城镇污水处理厂次氯酸钠消毒影响因素及优化研究[J].中国给水排水,2022,38(9):76-81.
- [30] 冯璁,林莉,李青云.氯离子浓度与电流密度对电解抑制铜绿微囊藻生长的影响[J].长江科学院院报,2015,32(6):53-58.
- [31] 刘伟, 蔡广强, 张金松, 等. 南方某市水源水蛋白质、腐殖酸浓度变化与去除[J]. 中国給水排水, 2017, 33(17). 41-45.
- [32] SHAH A D, LIU Z, SALHI E, et al. Peracetic acid oxidation of saline waters in the absence and presence of H₂O₂ secondary oxidant and disinfection byproduct formation[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(3): 1698-1705.
- [33] ZHANG L, LIU Y, FU Y. Degradation kinetics and mechanism of diclofenac by UV/peracetic acid[J]. RSC Advances, 2020, 10(17): 9907-9916.
- [34] CHEN S, CAI M, LIU Y, et al. Effects of water matrices on the degradation of naproxen by reactive radicals in the UV/peracetic acid process[J]. Water Research, 2019, 150: 153-161.
- [35] XIE P, MA J, LIU W, et al. Removal of 2-MIB and geosmin using UV/persulfate: Contributions of hydroxyl and sulfate radicals[J]. Water Research, 2015, 69: 223-233.
- [36] 蒋励铭, 卞静, 张晓晖, 等. 电化学活化过氧乙酸灭活水中大肠杆菌[J]. 中国环境科学, 2023, 43(8): 3966-3973.
- [37] ZHANG B, LI W, ZHANG H, et al. Activation of peracetic acid by trace ferrous ion and vacuum ultraviolet for the ultrafast degradation of PPCPs[J]. ACS ES& T Water, 2022, 2(12): 2590-2601.
- [38] AO X W, WANG W, SUN W, et al. Degradation and transformation of norfloxacin in medium-pressure ultraviolet/peracetic acid process: An investigation of the role of pH[J]. Water Research, 2021, 203: 117458.
- [39] AO X W, JUSSI E, HUANG C H, et al. Peracetic acid-based advanced oxidation processes for decontamination and disinfection of water: A review[J]. Water Research, 2021, 188: 116479.
- [40] BAI Y, SHI C, ZHOU Y, et al. Enhanced inactivation of *Escherichia coli* by ultrasound combined with peracetic acid during water disinfection[J]. Chemosphere,2023, 322: 138095.
- [41] CHEN S, LI X, WANG Y H, et al. Induction of *Escherichia coli* into a VBNC state through chlorination/chloramination and differences in characteristics of the bacterium between states [J]. Water Research, 2018, 142: 279-288.
- [42] FANG J, YANG X, MA J, et al. Characterization of algal organic matter and formation of DBPs from chlor (am) ination[J]. Water Research, 2010, 44(20): 5897-5906.

(责任编辑:曲娜)

Inactivation of *Escherichia coli* by peracetic acid combined with ultraviolet: Efficiency and mechanism

CHEN Jizhao¹, CHEN Zhenbin¹, CAO Lisan¹, CHENG Yujie¹, YUE Siyang², WANG Zongping¹, XIE Pengchao^{1,*}

School of Environmental Science and Engineering, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China;
School of Architecture and Urban Planning, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077, China
*Corresponding author, E-mail: xiepengchao555@163.com

Pathogens pose great risks to public health and ecosystems. In this study, we investigated the Abstract efficiency and mechanism of the UV/peracetic acid (UV/PAA) process in inactivating Escherichia coli (E. coli) which served as the reference microorganism. The effects of PAA, UV dosages and water matrices on the inactivation rates of E. coli were systematically assessed, the generated reactive species were detected and the changes in cell morphology during inactivation were observed. Results showed that with a PAA concentration of 60 μ mol·L⁻¹ and UV intensity of 2.25×10⁻⁷ Einstein·(s·L)⁻¹, the inactivation rate of *E. coli* reached 4.71 log after a 3 min reaction. An increase of 2.76 log and 0.82 log could be realized compared with that in the PAA alone and UV alone processes, respectively. Then, elevating the PAA concentrations and UV irradiation dosages would promote the inactivation efficiency. The inactivation rates of E. coli under UV/PAA were slightly inhibited by NH₄⁺ and Cl⁻, while humic acid (HA) exhibited a strong inhibitory effect. Moreover, the quenching experiments and electron paramagnetic resonance detection suggested that both hydroxyl (HO·) and organic radicals (RO·) contributed to the inactivation of E. coli. The observation using a confocal laser scanning microscope and a scanning electron microscope revealed that the inactivation of E. coli under UV/PAA caused slight damage to the cell membrane but did not result in complete cell integrity loss. Although the results from the fluorescence excitation-emission matrices analysis suggested the release of bacterial organic matter increased with cell membrane damage in the UV/PAA process, the released protein-like components with high molecular weight could be subsequently oxidized into humic acids-like components with low molecular weight. Keywords ultraviolet; peracetic acid; Escherichia coli; disinfection; radicals