

УДК 628.316.6 628.316.13 628.168.2

Антимикробные свойства биоцида на основе четвертичных аммонийных соединений и полигексаметиленгуанидина и потенциальные способы его дезактивации

© 2020 Ю.В. ЛИТТИ^{1*}, Д.В. СЕРДЮКОВ¹, О.В. КАНУННИКОВ², В.А. АКСЕЛЬРОД², Н.Г. ЛОЙКО¹

¹ *Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (ИНМИ РАН), Москва, 119071*

² *ООО «ЭКОТОЛ СЕРВИС» Москва, 105005*

*e-mail: litty-yuriy@mail.ru

Поступила в редакцию 21.05.2020 г.

После доработки 25.06.2020 г.

Принята к публикации 15.11.2020 г.

Биоцидные средства (БС) широко применяются в экологически чистых туалетных комплексах (ЭЧТК) пассажирских вагонов для подавления микробной жизнедеятельности в фекальных отходах (ФО). Последующая утилизация ФО, содержащих БС, в муниципальных очистных сооружениях негативно сказывается на их работе вследствие гибели активного ила. В работе исследовали антимикробные свойства БС на основе четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) и полигексаметиленгуанидина (ПГМГ), и способы его нейтрализации. Подтверждено, что БС на основе ЧАС и ПГМГ оказывает противомикробное действие на разные группы бактерий, уменьшая их численность в 10–100 и более раз. Было обнаружено, что в состав ФО входят две группы микроорганизмов с разной чувствительностью к БС. Исследованы способы дезактивации антимикробного действия БС в ФО, включающие: 1) использование дезактивирующего агента (ДА); 2) применение инкубации с термофильно сброженным осадком сточных вод — источником метаногенного сообщества микроорганизмов; 3) химическую дезактивацию путем закисления или защелачивания. Показано, что способ дезактивации БС в ФО с помощью термофильного метаногенного сбраживания (ТМС) с предварительной обработкой ФО сильной кислотой является наиболее предпочтительным.

Ключевые слова: биоцид, фекальные отходы ЭЧТК пассажирских вагонов, антимикробная активность, четвертичные аммониевые соединения, полигексаметиленгуанидин, дезактиватор, метаногенное микробное сообщество

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-115-126

«Биоцид» — общий термин, описывающий химический агент широкого спектра действия, инактивирующий микроорганизмы в низких концентрациях [1, 2]. Если применение биоцида способствует ингибированию роста, то в зависимости от объекта воздействия его эффект называют: бактериостатическим, фунгистатическим, споростатическим и т. д. Если же речь идет об уничтожении целевого организма, то действие биоцида называется бактерицидным, спорицидным,

вирулицидным и т. д. [3, 4]. В настоящее время известно большое число биоцидных веществ, имеющих различное химическое строение [2, 5]. На протяжении десятилетий они применяются человеком в дезинфицирующих составах, косметических средствах, консервантах, пестицидах, антисептиках, биодизелях и др. [1, 6–8].

Широкое применение биоциды получили в составе дезодорирующих средств, направленных на предотвращение биоразложения

Список сокращений: БС — биоцидное средство, ЭЧТК — экологически чистый туалетный комплекс, ФО — фекальные отходы, ЧАС — четвертичные аммониевые соединения, ПГМГ — полигексаметиленгуанидин, ПАВ — поверхностно-активное вещество, БПК — биохимическое потребление кислорода, ММС — метаногенное микробное сообщество, ДА — дезактивирующий агент, ТМС — термофильное метаногенное сбраживание.

Характеристика ФО**Characteristics of faecal sludge (FS)**

Наименование параметра	Ед. измерения	Значение
рН	—	9,6
Взвешенные вещества	мг/л	3150
БПК5	мг O ₂ /л	9750
ХПК	мг O ₂ /л	14520
Фосфаты	мг/л	88,2
Азот общий	мг/л	581
Аммоний	мг/л	491
Кадмий	мг/л	0,008
Медь	мг/л	0,083
Никель	мг/л	0,035
Хром общий	мг/л	0,018
Цинк	мг/л	0,361
Ртуть	мг/л	<0,0001
Нефтепродукты	мг/л	8,4
СПАВ анионогенные	мг/л	0,110

фекальных отходов (ФО) и устранения неприятного запаха в «биотуалетах», вакуумных туалетах самолетов [9, 10] и экологически чистых туалетных комплексах (ЭЧТК) на пассажирском железнодорожном транспорте [11]. В большинстве случаев в этих средствах используются четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) и производные гуанидина (например, полигексаметиленгуанидин (ПГМГ)), которые подавляют активность и/или вызывают гибель микроорганизмов и гельминтов [12, 13].

Известно, что ЧАС и ПГМГ относятся к катионным поверхностно-активным веществам (ПАВ), обладающим повышенной способностью к адсорбции на различных поверхностях, чем и обусловлена их высокая антимикробная активность. Связываясь с клеточной стенкой микроорганизмов, эти ПАВ вызывают её деформацию, что приводит к инактивации или гибели микробных клеток [14, 15]. В разных исследованиях было показано, что в концентрациях свыше 2 мг/л ЧАС подавляют процессы нитрификации [16]; свыше 10 мг/л — процессы биохимического потребления кислорода (БПК) [17]; а при концентрациях свыше 50 мг/л ингибируют денитрификацию [14, 18]. ПГМГ также обладает выраженной способностью ингибировать процессы БПК и негативно влиять на работу активного ила очистных сооружений [19].

Основным способом утилизации ФО, содержащих биоциды, является их сброс в канализацию для дальнейшей очистки. Помимо

негативного влияния на состояние активного ила очистных сооружений, это представляет собой дополнительный риск для общественного здравоохранения, так как может способствовать селекции патогенов, не восприимчивых к основным имеющимся противомикробным препаратам [20–22]. Однако, в настоящее время исследований, направленных на изучение токсического действия такого типа биоцидов, применяемых для биоконсервации ФО, и особенно на разработку способов их нейтрализации практически не проводится.

Целью данной работы стало исследование антимикробных свойств биоцидного средства на основе ЧАС и ПГМГ, применяемого для консервации фекальных отходов ЭЧТК пассажирских вагонов, а также разработка способов его дезактивации.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА**Объекты исследования.**

В работе использовали биоцидное средство (БС) «Латрина» производства ООО «Рейл Кемикал» (Россия), широко используемое в ЭЧТК подвижного состава АО «Федеральная Пассажирская компания» и ОАО «РЖД» для консервации ФО. В состав БС входили ЧАС, ПГМГ, ПАВ, отдушка, вода. Расход БС «Латрина» в ЭЧТК составляет 0,7 л на 1000 л жидких ФО (концентрация БС в ФО составляет 0,07%).

Жидкие ФО (с БС и без) были отобраны в начале июня 2019 года из ЭЧТК железнодорожных

поездов Октябрьской железной дороги. Характеристика ФО приведена в табл. 1 (данные любезно предоставлены испытательной лабораторией ООО «НПЦ «ПромЭнерго»).

В качестве источника метаногенного микробного сообщества (ММС) использовали термостатически сброженный осадок сточных вод Люберецких очистных сооружений.

Антимикробное действие БС на разные группы микроорганизмов. Антимикробное действие БС изучали с использованием следующих штаммов микроорганизмов из коллекции ИНМИ РАН: грамотрицательных бактерий *Pseudomonas aeruginosa* 4,8, *Escherichia coli* 4S; грамположительных неспорообразующих бактерий *Micrococcus luteus* NCIMB 13267, *Staphylococcus aureus* 209P; грамположительных спорообразующих бактерий *Bacillus cereus* 504; *Bacillus subtilis* 720; дрожжей *Yarrowia lipolytica* 367–2.

Бактерии выращивали на среде Luria-Bertani ((LB); Broth, Miller, VWR Life Science, USA). Культивирование осуществляли в колбах на 250 мл с 50 мл питательной среды при перемешивании на орбитальной качалке (120 об./мин) и температуре 28 °С. Инокулят — культуру начала стационарной фазы, вносили в количестве 0,25 мл на 50 мл среды (0,5% об.). Предварительно проводили стандартизацию культур микроорганизмов. Для получения экспоненциальных клеток культивирование осуществляли в течение 6–8 ч, получая титр клеток $(5,0 \pm 0,4) \cdot 10^8$ в мл. Для получения стационарных клеток культивирование осуществляли в течение 24–48 ч, получая титр клеток $(2 \pm 0,3) \cdot 10^9$ в мл. Перед использованием клетки дважды отмывали от среды роста физраствором (0,9% NaCl).

Анаэробное культивирование *E. coli* 4S проводили в стеклянных флаконах объемом 265 мл с 160 мл среды LB. Инокулят — культуру начала стационарной фазы, вносили в количестве 0,5% об. После внесения компонентов газовую фазу тщательно продували азотом, флаконы герметично закрывали резиновыми пробками. Флаконы инкубировали при температуре 28 °С без перемешивания в течение 48 ч.

В клеточные популяции перечисленных выше микроорганизмов вносили БС до конечной концентрации 0,07% (соответствует концентрации БС, используемой для консервации ФО в ЭЧТК) и 0,14%. После 15 мин и 1 ч инкубации реакцию останавливали, трижды отмывая клетки физраствором. Далее аликвоты отмытых от БС культур рассеивали на агаризованную среду LB (с 2%-ным агар-агаром). Подсчитывали количество выросших колоний и оценивали изменение титра

жизнеспособных бактерий, по сравнению с контрольной популяцией (без внесения БС).

Исследование численности аэробных микроорганизмов в ФО. Аликвоты ФО после соответствующего разведения высевались на агаризованные среды: 1) LB (с 2%-ным агар-агаром); и 2) Reinforced clostridial medium ((RCM); Merck, USA)

Посевы инкубировали при температуре 28 °С в течение 3 сут. Через 1 и 3 сут подсчитывали количество выросших колоний в соответствующих разведениях и рассчитывали титр микроорганизмов в исходном ФО.

Применение дезактивирующего раствора (ДА) для нейтрализации БС в ФО. В работе использовали дезактивирующий раствор (ДА) следующего состава: Твин-80 — 10%; сапонин — 10%; гистидин — 0,3%; цистеин — 0,3%; вода дистиллированная до 100%. ДА стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 мин.

Проведение экспериментов с аэробной частью микробной популяции ФО.

ДА вносили в ФО до конечной концентрации 7 и 30%. После 15, 30 мин и 2 сут инкубации определяли количество живых микроорганизмов в образцах методом подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ) после высева на агаризованные среды LB. Далее оценивали изменение титра микроорганизмов, в опытных образцах по сравнению с контрольным образцом ФО без внесения ДА.

Проведение экспериментов с анаэробной частью микробной популяции ФО.

В стеклянные флаконы объемом 265 мл вносили 150 мл ФО. рН ФО снижали с 9,4 до 7,0 добавлением концентрированной HCl. В опытных вариантах в ФО добавляли ДА до конечной концентрации 7 и 30%. После внесения компонентов газовую фазу тщательно продували азотом, флаконы герметично закрывали резиновыми пробками. Резиновые пробки протыкали толстой медицинской иглой сквозь ребро жесткости, к основанию иглы присоединяли 0,5 л мешок с металлизированной поверхностью (E-Switch, Китай) для сбора образующегося биогаза. Флаконы инкубировали при температуре 28 °С. Перемешивание осуществляли вручную 1 раз в сут. Периодически измеряли количество образовавшегося биогаза.

Измерение объема образующегося биогаза осуществляли с использованием шприца объемом 50 мл. Наконечник шприца присоединяли к клапану мешка с помощью силиконовой трубки. Биогаз эвакуировали из мешка путем вытягивания плунжера из цилиндра шприца. Объем эвакуированного газа соответствовал положению основания плунжера на шкале, нанесенной на цилиндр шприца.

Применение термофильно сброженного осадка сточных вод для нейтрализации БС в ФО.

В стеклянные флаконы объемом 265 мл вносили 80 мл ФО. рН ФО снижали с 9,4 до 7,0 добавлением концентрированной HCL. В опытных вариантах в ФО добавляли 40 мл термофильно сброженного осадка сточных вод — источника метаногенного микробного сообщества. В одном из опытных вариантов в смесь компонентов добавляли ДА до конечной концентрации 7%. В контрольных вариантах во флаконы вносили только 40 мл осадка.

После внесения компонентов газовую фазу тщательно продували азотом, флаконы герметично закрывали резиновыми пробками. Резиновые пробки протыкали толстой медицинской иглой сквозь ребро жесткости, к основанию иглы присоединяли 0,5 л мешок с металлизированной поверхностью (E-Switch) для сбора образующегося биогаза. Флаконы инкубировали в термофильных (55 °С) условиях. Перемешивание осуществляли вручную 1 раз в сут. Периодически измеряли количество образовавшегося биогаза, а также содержание в нем метана методом газо-жидкостной хроматографии (Кристалл 5000.2, «Хроматэк», Россия).

Обработка ФО концентрированным раствором кислоты.

В стеклянные флаконы объемом 265 мл вносили 80 мл ФО. рН ФО снижали с 9,4 до 4,5 внесением концентрированной (37%) HCL. После инкубирования ФО в течение сут, рН ФО доводили до 7,0 путем добавления 20% NaOH.

Обработка ФО концентрированным раствором щелочи.

В стеклянные флаконы объемом 265 мл вносили 80 мл ФО. рН ФО повышали с 9,4 до 13,5 внесением 20% NaOH. После инкубирования ФО в течение сут рН ФО доводили до 7,0 с помощью концентрированной (37%) HCL.

Применение термофильно сброженного осадка сточных вод для исследования деактивации БС в экспериментах с обработкой ФО сильной кислотой и щелочью.

После обработки ФО сильной кислотой или щелочью и восстановления рН раствора до нейтральных значений в опытные варианты добавляли 40 мл термофильно сброженного осадка сточных вод. Газовую смесь тщательно продували азотом, флаконы герметично закрывали и инкубировали в термофильных (55 °С) условиях, перемешивая вручную раз в сут. Периодически измеряли количество образовавшегося биогаза, а также содержание в нем метана методом как описано выше.

Статистическая обработка данных.

Все эксперименты проводили в трёхкратной повторности. Для обработки результатов использовали стандартные математические методы (t-тест Стьюдента и расчет среднеквадратичного отклонения). Группу данных считали однородной, если среднеквадратичные отклонения σ не превышали 10%. Различия между группами данных считали достоверными при критерии вероятности $p > 0,95$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Антимикробное действие БС в отношении различных групп микроорганизмов

Исследование антимикробного действия биоцидного средства проводили на разных, наиболее часто встречающихся в природных экосистемах, а также в ФО группах микроорганизмов, подвергая их популяции воздействию БС.

Оказалось, что БС по-разному влияет на разные группы микроорганизмов (табл. 2).

Наиболее чувствительны к его действию были грамположительные бактерии как спорообразующие, так и не спорообразующие, численность которых уменьшалась в 25–1000 раз даже при 15 мин воздействии меньшей (0,07%) концентрации. В случае грамположительной бактерии *S. aureus* при добавлении к культуре стационарной фазы БС в концентрации 0,14% уже через 15 мин наблюдалось полное подавление роста. Клетки грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* и *E. coli*, а также эукариотические клетки дрожжей *Y. lipolytica* были намного менее чувствительны к воздействию БС. Самой устойчивой к действию биоцида в нашем исследовании оказалась бактерия *P. aeruginosa*, численность жизнеспособных клеток которой даже в экспоненциальной фазе роста при часовом воздействии БС в концентрации 0,14% снижалась менее чем на порядок, а в стационарной — чуть более, чем в 3 раза. Полученные данные хорошо согласуются с исследованиями японских учёных, выделивших из активного ила очистных сооружений устойчивые к действию ЧАС изоляты *Pseudomonas* и показавших способность одного из них, *Pseudomonas fluorescens* TN4, ассимилировать ЧАС посредством процесса N-деалкилирования [17].

Следует отметить, что в режиме анаэробного роста бактериальная популяция *E. coli* становилась более чувствительна к воздействию БС. Это может свидетельствовать о более сильном антимикробном действии БС на анаэробную микробиоту ФО.

Таким образом, исследование антимикробного действия БС в отношении различных групп

Антимикробное действие БС на клетки различных групп микроорганизмов

Antimicrobial action of a biocidal agent (BA) on various groups of microorganisms

Микроорганизм	Фаза роста	Титр жизнеспособных микроорганизмов, клеток/мл, (в % от контрольных значений)		
		контроль	15 мин возд. БС	1 ч возд. БС
концентрация БС 0,07%				
<i>Ps. aeruginosa</i> 4.8.ч1	эксп	(4,9±0,2)·10 ⁹ (100)	(3,8±0,2)·10 ⁹ (77,5)	(1,3±0,1)·10 ⁸ (26,5)
<i>Ps. aeruginosa</i> 4.8.1	стац	(1,1±0,3)·10 ¹⁰ (100)	(9,9 ± 0,4)·10 ⁹ (90,0)	(9,0±0,3)·10 ⁹ (81,8)
<i>E. coli</i> шт. 4S эксп. фаза роста	эксп	(1,3±0,1)·10 ⁹ (100)	(1,7±0,3)·10 ⁸ (13,0)	(4,1±0,1)·10 ⁷ (3,2)
<i>E. coli</i> шт. 4S	стац	(5,7±0,3)·10 ⁹ (100)	(3,2 ± 0,2)·10 ⁹ (56,1)	(8,5±0,5)·10 ⁸ (14,9)
<i>E. coli</i> шт. 4S анаэробные усл.	стац	(4,1±0,2)·10 ⁹ (100)	(6,0 ± 0,4)·10 ⁷ (14,6)	(2,5±0,2)·10 ⁷ (6,1)
<i>M. luteus</i>	стац	(2,1±0,2)·10 ⁹ (100)	(5,1±0,1)·10 ⁷ (2,4)	(1,4±0,1)·10 ⁷ (0,7)
<i>St.aureus</i> шт. 209P;	стац	(1,1±0,2)·10 ⁹ (100)	(4,3±0,3)·10 ⁷ (3,9)	(8,5±0,2)·10 ⁶ (0,8)
<i>B. cereus</i> шт. 504;	стац	(3,3±0,3)·10 ⁸ (100)	(1,6±0,1)·10 ⁶ (0,5)	(4,7±0,1)·10 ⁵ (0,1)
<i>B. subtilis</i> шт. P-800	стац	(2,7±0,1)·10 ⁹ (100)	(9,3 ± 0,1)·10 ⁷ (3,4)	(6,5±0,5)·10 ⁶ (0,24)
<i>Y. lipolytica</i> 367-2	стац	(5,6±0,3)·10 ⁸ (100)	(3,3 ± 0,1)·10 ⁸ (58,9)	(5,2±0,4)·10 ⁷ (9,2)
концентрация БС 0,14%				
<i>Ps. aeruginosa</i> 4.8.1	эксп	(4,9±0,2)·10 ⁹ (100)	(1,8±0,1)·10 ⁹ (36,7)	(6,3±0,4)·10 ⁸ (12,9)
<i>Ps. aeruginosa</i> 4.8.1	стац	(1,1±0,3)·10 ¹⁰ (100)	(7,2 ± 0,2)·10 ⁹ (65,5)	(3,1±0,5)·10 ⁹ (28,2)
<i>E. coli</i> шт. 4S	эксп	(1,3±0,1)·10 ⁹ (100)	(1,2±0,2)·10 ⁷ (0,9)	(1,1±0,1)·10 ⁶ (0,08)
<i>E. coli</i> шт. 4S	стац	(5,7±0,3)·10 ⁹ (100)	(2,9 ± 0,2)·10 ⁸ (10,3)	(8,7±0,5)·10 ⁷ (1,5)
<i>E. coli</i> шт. 4S анаэробные усл.	стац	(4,1±0,2)·10 ⁹ (100)	(9,2 ± 0,4)·10 ⁷ (2,2)	(5,5±0,5)·10 ⁶ (0,13)
<i>M. luteus</i>	стац	(2,1±0,2)·10 ⁹ (100)	(6,7±0,3)·10 ⁶ (0,3)	(4,3±0,2)·10 ⁴ (0,002)
<i>St.aureus</i> шт. 209P;	стац	(1,1±0,2)·10 ⁹ (100)	0 (0)	0 (0)
<i>B. cereus</i> шт. 504;	стац	(3,3±0,3)·10 ⁸ (100)	(2,7±0,2)·10 ⁴ (0,8)	(2,6±0,1)·10 ³ (0,08)
<i>B. subtilis</i> шт. P-800.	стац	(2,7±0,1)·10 ⁹ (100)	(2,3 ± 0,1)·10 ⁷ (0,9)	(8,1±0,5)·10 ⁵ (0,003)
<i>Y. lipolytica</i> 367-2	стац	(5,6±0,3)·10 ⁸ (100)	(1,3 ± 0,1)·10 ⁸ (23,2)	(9,2±0,4)·10 ⁶ (1,6)

микроорганизмов, выявившее их разную чувствительность к биоциду, дает основание предположить наличие в законсервированных с помощью БС ФО разных по потенциалу к возобновлению роста групп микроорганизмов.

Влияние БС на микробную популяцию ФО

Титр жизнеспособных микроорганизмов в ФО, законсервированных с помощью БС и без него, исследовали методом подсчета КОЕ при рассеивании на плотные среды LB и RCM (табл. 3).

Влияние БС на титр жизнеспособных микроорганизмов в ФО

The effect of a biocidal agent (BA) on the titer of viable microorganisms in faecal sludge (FS)

Вариант	Титр жизнеспособных микроорганизмов, клеток/мл			
	на среде LB		на среде RCM	
	через 1 сут	через 3 сут	через 1 сут	через 3 сут
ФО без БС	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(2,3 \pm 0,1) \cdot 10^7$	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$
ФО с БС	$(3,6 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^8$	$(4,8 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^8$

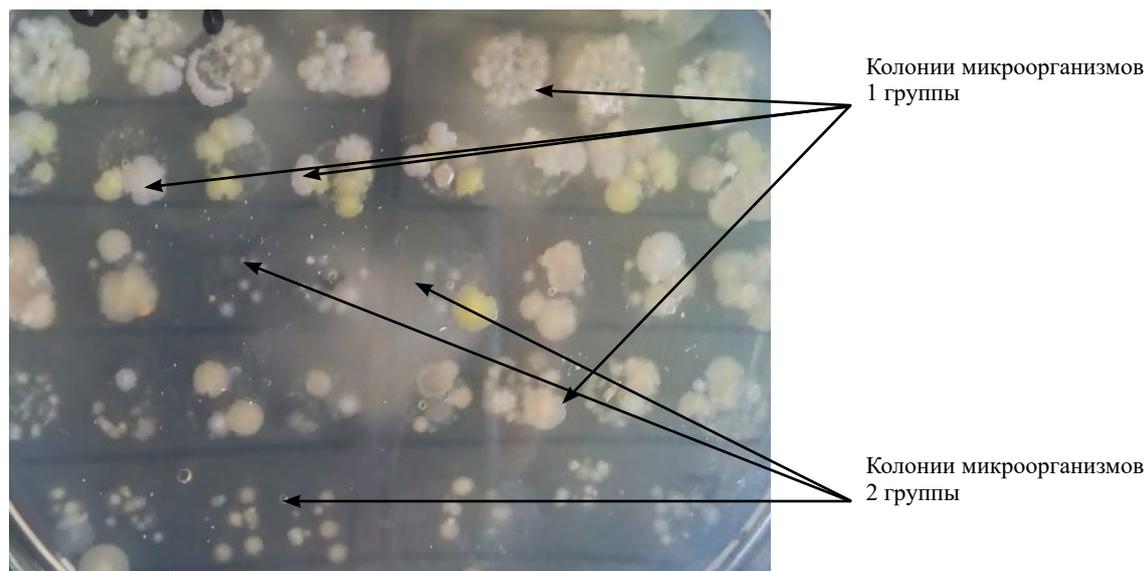


Рис. 1. Вид колоний микроорганизмов, выросших после посева ФО на агаризованную среду LB.

Fig. 1. Appearance of colonies of microorganisms after plating faecal sludge (FS) onto an LB agar medium.

Таким образом учитывали количество аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов, способных образовывать колонии на этих богатых агаризованных средах. Через сут титр клеток, выявляемых в ФО без БС был в пять раз выше, чем в законсервированных биоцидом.

Через 3 сут инкубирования в обоих вариантах выявлялась вторая группа микроорганизмов, более многочисленная, дающая на агаризованных средах LB и RCM мелкие колонии (рис. 1). Титр клеток при этом в обоих вариантах ФО практически совпадал. Более богатый состав среды RCM (включающий, в том числе глюкозу и цистеин) позволял выявить большее число микроорганизмов в обеих группах.

В результате экспериментов установлено, что БС, используемое для консервации ФО в концентрациях 0,07%, ингибирует рост быстрорастущих микроорганизмов, что, по-видимому, можно отнести к бактериостатическому эффекту. Вероятно, большая часть БС адсорбируется на поверхности частиц ФО, тем самым снижая его эффективные концентрации в среде [14, 15]. Этим объясняется

то, что при одинаковых исходных концентрациях БС его антимикробное действие на суспензию клеток (см. предыдущий раздел) значительно выше, чем на микроорганизмы в ФО, содержащем большое количество взвешенных веществ (табл. 1). После посева на новую среду (без БС) большая часть микробной популяции ФО возобновляет свой рост.

Так как для экологически чистой утилизации ФО необходимо разрушить содержащееся в нем БС или значительно снизить его антимикробное действие, то следующая часть работы была посвящена разработке способов нейтрализации БС в ФО.

Нейтрализация БС с помощью дезактивирующего раствора

Основным способом утилизации ФО туалетов пассажирских вагонов является их сдача на очистные сооружения. Однако, наличие в них БС может привести к серьезному ущербу для активного ила, особенно на локальных очистных сооружениях в относительно небольших населенных

Влияние ДА на титр жизнеспособных микроорганизмов в ФО с БС

Англ название Effect of a deactivating agent (DA) on the titer of viable microorganisms in faecal sludge (FS) containing biocidal agent

Время инкубации ДА с ФО	Титр жизнеспособных микроорганизмов, клеток/мл, (в % от контрольных значений)			
	30% ДА		7% ДА	
	Через 1 сут	Через 3 сут	Через 1 сут	Через 3 сут
0 (контроль)	$(3,6 \pm 0,6) \cdot 10^6$ (100)	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^8$ (100)	$(3,6 \pm 0,6) \cdot 10^6$ (100)	$(1,2 \pm 0,3) \cdot 10^8$ (100)
15 мин	$(4,6 \pm 0,5) \cdot 10^6$ (128)	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^8$ (125)	$(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^6$ (106)	$(1,4 \pm 0,6) \cdot 10^8$ (117)
30 мин	$(4,9 \pm 0,2) \cdot 10^6$ (136)	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^8$ (183)	$(4,2 \pm 0,5) \cdot 10^6$ (116)	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^8$ (142)
2 сут	$(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^9$ ($5,6 \cdot 10^4$)	$(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^9$ (208)	$(5,1 \pm 0,5) \cdot 10^6$ (142)	$(1,8 \pm 0,1) \cdot 10^8$ (150)

пунктах, где степень разбавления ФО, способная снизить действующую концентрацию БС, незначительна. Возникает необходимость разработки способов нейтрализации токсического действия БС перед утилизацией.

Одним из наиболее эффективных и экономически выгодных способов дезактивации бицидных соединений является применение веществ, способных нейтрализовать их действие [23, 24]. В ряде патентных исследований для нейтрализации подобных соединений предложено применять дезактивирующий раствор (ДА), компонентами которого являются Твин-80, сапонин, гистидин и цистеин в концентрациях от 5 до 50 об.% [25, 26].

Приготовленный ДА вносили в ФО так, чтобы его конечная концентрация составляла 7 или 30%. После инкубации в течение 15, 30 мин и 2 сут производили подсчет количества живых микроорганизмов (определяя число КОЕ). Оказалось, что ДА увеличивал титр микроорганизмов, дающих колонии на агаризованной среде, как в первой быстрорастущей группе микроорганизмов, так и во второй группе, дающей колонии только через 3 сут (табл. 4).

При этом эффект был прямо пропорционален как концентрации вносимого ДА, так и времени его инкубации с ФО. Внесение 7% ДА позволяло добиться увеличения титра клеток до уровня $1,8 \cdot 10^8$, что практически совпадало с титром клеток в ФО, не законсервированных БС. Тогда как при инкубации с высокой дозой ДА (30%), титр быстрорастущих микроорганизмов, выявляемый подсчетом КОЕ, уже через сут составлял $2,0 \cdot 10^9$ клеток/мл, что на порядок выше микробного титра в образце ФО без БС. Следовательно, в этих условиях произошла

не только нейтрализация БС, но и активация роста микроорганизмов.

В параллельно поставленных экспериментах, позволяющих учесть активность анаэробных микроорганизмов, влияние ДА оценивали по увеличению выхода биогаза в процессе 30 сут инкубации при температуре 28 °С. Было показано, что в опытных вариантах с добавлением к законсервированному ФО ДА выход биогаза был в 5–7 раз выше, чем в контрольном (без ДА) (рис.2), что подтверждает высокую эффективность предложенного метода дезактивации бицида. Причем, достаточно высокий выход биогаза достигался уже при добавлении ДА в концентрации 7%, что позволяет в дальнейших экспериментах использовать эту концентрацию ДА.

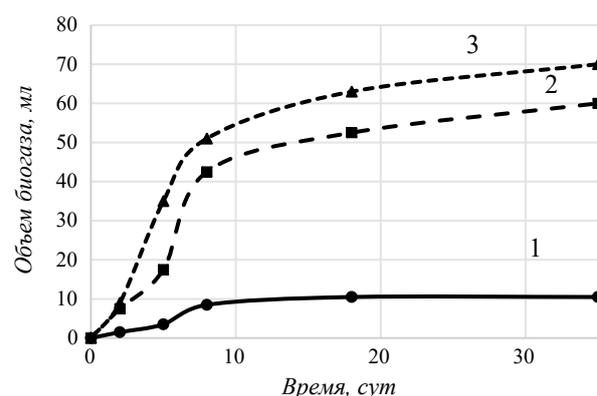


Рис. 2. Влияние ДА на динамику образования биогаза в ФО в анаэробных условиях. 1— контроль, без внесения ДА; 2 — концентрация ДА 7%; 3 — ДА 30%.

Fig. 2. Influence of a deactivating agent (DA) on the dynamics of biogas formation in faecal sludge (FS) under anaerobic conditions. 1— control, without adding DA; 2 — DA concentration 7%; 3 — DA 30%.

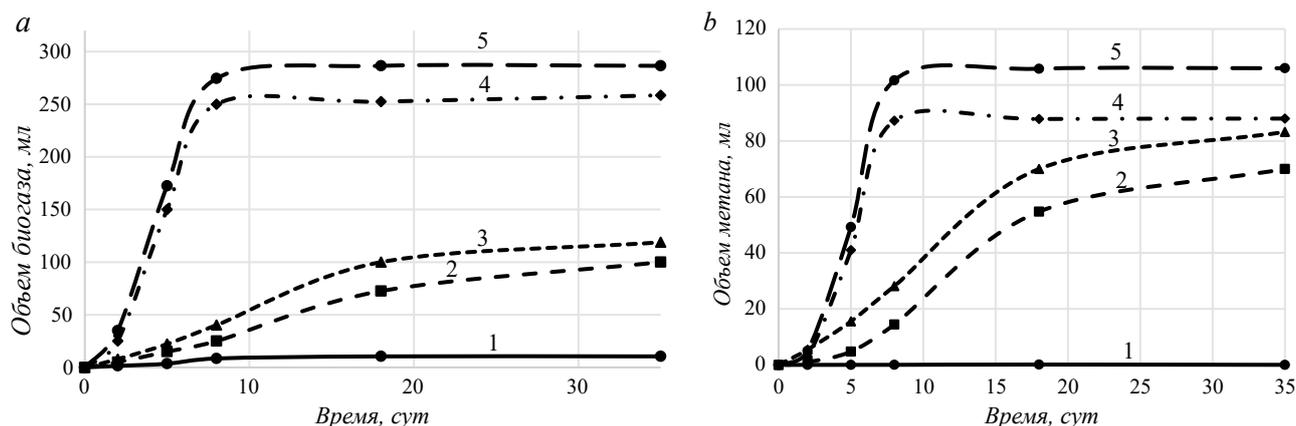


Рис. 3. Динамика образования биогаза (а) и метана (б) из ФО при использовании метаногенного микробного сообщества (ММС) в анаэробных условиях. 1 — ФО; 2 — ММС; 3 — ФО + ММС; 4 — ММС + ДА 7%; 5 — ФО + ММС + ДА 7%.

Fig. 3. Dynamics of biogas (a) and methane (b) production from faecal sludge (FS) using the methanogenic microbial community (MMC) under anaerobic conditions. 1 — FS; 2 — MMC; 3 — FS + MMC; 4 — MMC + DA 7%; 5 — FS + MMC + DA 7%.

Нейтрализация БС с помощью термофильно сброженного осадка сточных вод

Другим возможным способом, позволяющим снизить токсическое действие БС в ФО для их дальнейшей переработки, может являться внесение в ФО дополнительного источника микробиологического материала, способного нейтрализовать (или ассимилировать) БС. В нашей работе решено было использовать с этой целью термофильно сброженный осадок сточных вод из Люберецких очистных сооружений, являющийся источником метаногенного микробного сообщества (ММС), который вносили в ФО в соотношении 1:2. В одном из вариантов дополнительно добавляли 7% ДА. Процесс вели в анаэробных условиях при температуре 55 °С.

В составе ММС кроме метаногенов присутствуют ещё три функциональные группы микроорганизмов: гидролитики, бродильщики и ацетогены, что позволяет эффективно проводить процессы разложения большого спектра органических веществ. Повышение температуры процесса до 50–57 °С ведет к увеличению скорости биохимических реакций, а, следовательно, сокращению времени разложения органического вещества. Кроме того, есть данные, что присутствие ЧАС до 50 мг/л существенно не влияет на снижение выхода метана при термофильном метаногенном сбраживании (ТМС) пищевых отходов [27].

Внесение термофильно сбраживаемого осадка в ФО способствовало увеличению выхода биогаза в 10 раз по сравнению с контрольной популяцией законсервированных ФО, и в 1,4 раза по сравнению с контрольной

суспензией ММС, инкубируемой в тех же условиях (рис 3а). Таким образом, путем внесения метаногенной микробной популяции удалось не только нейтрализовать действие БС, но и активизировать микробиоту ФО. В экспериментах с дополнительным внесением ДА выход биогаза был значительно выше, а тенденция к увеличению выхода биогаза благодаря ММС сохранялась. Фиксируя в данном эксперименте не только общий уровень выхода биогаза, но и содержание в нем метана, удалось обнаружить, что после добавления ММС к ФО активизируются и метаногенное микробное сообщество (рис. 3б). При этом доля метана в образующемся биогазе была очень высока — до 80%, против обычных (без добавления ММС) 55–75%. Вероятно, это связано с разложением карбамида, содержащегося в ФО, и последующего за этим увеличением щелочности среды, вызывающем дополнительное связывание углекислого газа в жидкой фазе.

В то же время в опытах с добавлением ДА концентрация метана в биогазе была значительно ниже — около 40%, даже несмотря на то, что в ДА содержится большое количество био-разлагаемых органических соединений (Твин 80, сапонины). По-видимому, их присутствие не благоприятно для метанобразования, так как содержащиеся в молекуле Твин 80 остатки олеиновой кислоты могут прикрепляться к клеточной мембране, ограничивать массоперенос и ингибировать активность ММС [28].

Таким образом, добавление ММС к ФО способствует увеличению выхода биогаза с высоким содержанием метана, что указывает

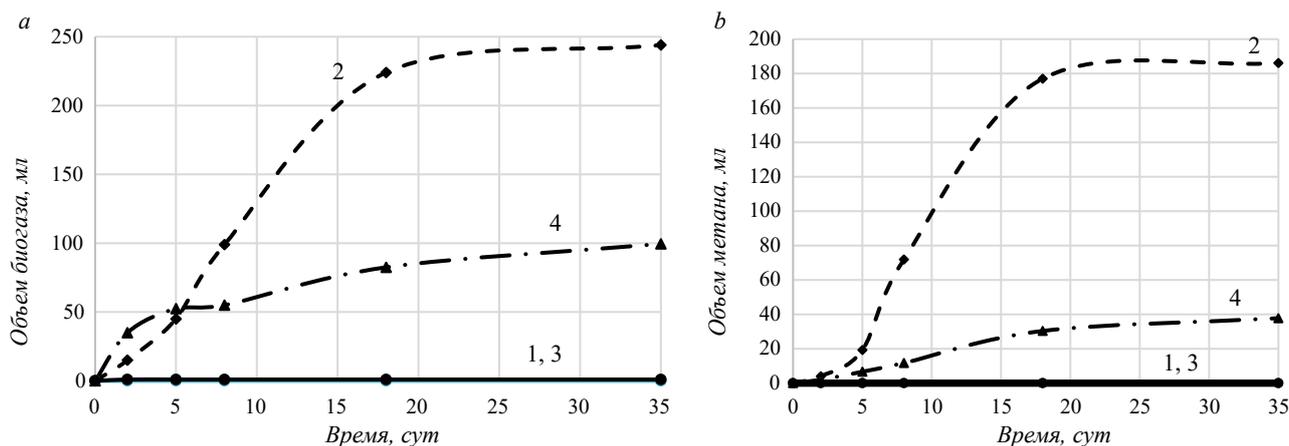


Рис. 4. Динамика образования биогаза (a) и метана (b) из денатурированного щелочью или кислотой ФО при использовании метаногенного микробного сообщества (ММС) в анаэробных условиях. 1 — ФО, денатурированные кислотой; 2 — ФО, денатурированные кислотой + ММС; 3 — ФО, денатурированные щелочью; 4 — ФО, денатурированные щелочью + ММС.

Fig. 4. Dynamics of biogas (a) and methane (b) production from faecal sludge (FS), pretreated with strong alkali or acid, using the methanogenic microbial community (MMC) under anaerobic conditions. 1 — FS, pretreated with acid; 2 — FS, pretreated with acid + MMC; 3 — FS, pretreated with alkali; 4 — FS, pretreated with alkali + MMC.

на привлекательность использования метода ТМС как метода утилизации ФО, содержащих БС.

Нейтрализация БС обработкой ФО сильными кислотой или щелочью

Ещё одним возможным способом нейтрализации БС, содержащих ЧАС и ПГМГ, может быть их дезактивация, в результате гидролиза в кислых или щелочных условиях. В ряде работ описан ускоренный гидролиз ПГМГ [15] и ЧАС [29] при снижении pH среды за счет внесения сильной кислоты. В щелочных условиях также возможен гидролиз ЧАС [30] и ПГМГ [15], хотя скорость разложения последнего намного ниже, чем в кислых.

Для проверки этих способов нейтрализации БС, ФО подвергали кислотному и щелочному гидролизу. Затем, для оценки степени нейтрализации БС в ФО в опытные образцы вносили ММС и проводили дальнейшее инкубирование смесей в термофильных условиях (при 55 °C). В контрольных вариантах без добавления ММС газообразования не наблюдалось (рис. 4a,b, кривые 1,3).

В опытных — фиксировалось увеличение выхода биогаза, что свидетельствует об активизации деятельности микроорганизмов (рис 4a,b, кривые 2,4). Явное преимущество наблюдалось в случае кислотного гидролиза ФО, когда выход биогаза был выше в 2,5 раза, чем в варианте с обработкой ФО с помощью щелочного гидролиза.

При сравнении результатов экспериментов с ФО, предварительно гидролизованного щелочью, и ФО без обработки оказалось, что выход биогаза остался на том же уровне, что и в случае

внесения ММС в необработанные ФО (рис. 3a, кривая 3). При этом доля метана в биогазе даже в 2 раза снизилась. Вероятно, это связано с образованием в щелочных условиях токсичных продуктов разложения ЧАС и ПГМГ [15] и/или дополнительной десорбцией ЧАС со взвешенных частиц ФО [31].

Напротив, инкубация ММС на гидролизованной кислотой ФО приводила к увеличению выхода биогаза в 2,4 раза по сравнению с экспериментами, когда использовали ФО без какой-либо обработки (рис. 3a кривая 3). При этом по выходу биогаза эти результаты были сравнимы с эффектом, к которому приводила нейтрализация БС с помощью ДА (рис. 3a, кривая 5). Содержание метана в биогазе в этом случае было в 1,7 раза выше (рис. 4b, кривая 4). Возможно, часть выделившегося метана — это результат анаэробной деградации ММС органического вещества частично лизированного в результате гидролиза микробной популяции ФО. Однако, эффект также может быть связан и с инактивацией БС.

Сравнительная характеристика и экономическая оценка способов дезактивации БС

Сравнение предложенных способов дезактивации БС в ФО для выбора наиболее оптимального по техническим характеристикам проводили, используя данные по выходу биогаза и метана. Для экономической оценки учитывали стоимость реагентов и потенциально возможные затраты на организацию модифицированного

Сравнительная характеристика методов дезактивации БС в ФО**Comparative characteristics of methods for deactivation of a biocidal agent (BA) in faecal sludge (FS)**

Методы дезактивации БС	выход биогаза, л/т	выход метана, л/т	Суммарное количество реагентов для обработки, кг/т	Суммарная стоимость реагентов, руб/т	Эффективность	Себестоимость
Контроль	131	—	3,2	38	Низкая	Низкая
ДА 7%	750	—	70,0	2951	Средняя	Высокая
ДА 30%	875	—	300,0	12645	Средняя	Высокая
ТМС	1488	1038	3,2	38	Средняя	Низкая
ДА 7% + ТМС	3588	1325	70,0	2951	Высокая	Высокая
Обработка сильной кислотой + ТМС	3050	2325	25,5	901	Высокая	Средняя
Обработка сильной щелочью + ТМС	1250	475	95,8	2827	Средняя	Высокая

процесса дезактивации законсервированных БС ФО (табл. 5). Наиболее эффективным методом нейтрализации БС в ФО оказалось термофильное метаногенное сбраживание (ТМС) с предварительной обработкой сильной кислотой или с внесением 7% ДА.

Однако, использование ДА значительно увеличивает себестоимость метода, что снижает возможность применения этого варианта на практике. Таким образом, способ дезактивации БС в ФО с помощью ТМС с предварительной обработкой ФО сильной кислотой является наиболее предпочтительным и может быть предложен для дальнейших пилотных исследований в условиях непрерывного процесса [32].

В работе исследовали антимикробные свойства биоцидного средства «Латрина», содержащего ЧАС и ПГМГ и применяемого для консервации фекальных отходов в ЭЧТК на пассажирском железнодорожном транспорте. Было показано, что биоцидное средство обладает антимикробным действием на разные группы бактерий, уменьшая их численность в 10–100 и более раз. БС в концентрации 0,07%, несмотря на вероятную адсорбцию на поверхности взвешенных веществ ФО, ингибирует рост быстрорастущих микроорганизмов, проявляя бактериостатический эффект.

Так как сброс ФО, содержащих БС, в канализационные очистные сооружения для утилизации может значительно ухудшать их нормальную работу, то предложенные способы дезактивации антимикробного действия БС, включающие использование дезактивирующего агента на основе катионных ПАВ, инкубации с термофильно сброженным осадком сточных вод, и химическую дезактивацию путем закисления, имеют важное экологическое

значение. Термофильное метаногенное сбраживание с предварительной обработкой сильной кислотой характеризовалось оптимальным соотношением стоимости и эффективности среди использованных в работе методов нейтрализации БС в ФО.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ.

ЛИТЕРАТУРА

- McDonnell G., Russell A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, 12(1), 147–179
doi:10.1128/cmr.14.1.227-227.2001
- Paul D., Chakraborty R., Mandal S.M. Biocides and health-care agents are more than just antibiotics: Inducing cross to co-resistance in microbes *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2019, 174, 601–610.
doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.02.083
- Lemmer K., Howaldt S., Heinrich R. et al. Test methods for estimating the efficacy of the fast-acting disinfectant peracetic acid on surfaces of personal protective equipment *J Appl Microbiol.*, 2017, 123(5), 1168–1183.
doi: 10.1111/jam.13575.
- Bernardi A.O., Stefanello A., Lemos J.G. et al. Antifungal activity of commercial sanitizers against strains of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Hyphopichia burtonii*, and *Aspergillus pseudoglaucus*: Bakery spoilage fungi *Food Microbiol.*, 2019, 83, 59–63.
doi: 10.1016/j.fm.2019.04.005
- Maillard, J.-Y. Resistance of Bacteria to Biocides *Microbiol Spectrum*, 2018, 6(2).
doi: 10.1128/microbiolspec.arba-0006-2017

6. Papp S., Kimmerl K., Gatz J. et al. Evaluation of Sporicidal Disinfectants for the Disinfection of Personal Protective Equipment During Biological Hazards *Health Secur.*, 2020, 18(1), 36–48. doi: 10.1089/hs.2019.0128
7. Li W., Cicek N., Levin D.B., Logsetty S., Liu S. Bacteria-triggered release of a potent biocide from core-shell polyhydroxyalkanoate (PHA)-based nanofibers for wound dressing applications *J Biomater Sci Polym Ed.*, 2020, 31(3), 394–406. doi: 10.1080/09205063.2019.1693882
8. Luz G.V.S., Sousa B.A.S.M., Guedes A.V. et al. Biocides Used as Additives to Biodiesels and Their Risks to the Environment and Public Health: A Review *Molecules*, 2018, 23(10), 2698. doi: 10.3390/molecules23102698
9. Kuo J. Disinfection processes *Water Environ Res.*, 2017, 89(10), 1206–1244. doi: 10.2175/106143017X15 023776270278
10. Sozzi E., Baloch M., Strasser J. et al. A bioassay-based protocol for chemical neutralization of human faecal wastes treated by physico-chemical disinfection processes: A case study on benzalkonium chloride *Int J Hyg Environ Health*, 2019, 222, 155–167. doi: 10.1016/j.ijheh.2018.07.002
11. Юдаева О.С., Канунников О.В., Аксельрод В.А., Алехин С.Ю. Обеспечение санитарно-гигиенической и противоэпидемиологической безопасности железнодорожного подвижного состава при использовании сантехнических систем замкнутого типа *Наука и техника транспорта*, 2017, 3, 66–69.
12. Protasov A., Bardeau J.F., Morozovskaya I. et al. New promising antifouling agent based on polymeric biocide polyhexamethylene guanidine molybdate *Environ Toxicol Chem.*, 2017, 36(9), 2543–2551. doi: 10.1002/etc.3782
13. Park Y.J., Jeong M.H., Bang I.J. et al. Guanidine-based disinfectants, polyhexamethylene guanidine-phosphate (PHMG-P), polyhexamethylene biguanide (PHMB), and oligo(2-(2-ethoxy)ethoxyethyl guanidinium chloride (PGH) induced epithelial-mesenchymal transition in A549 alveolar epithelial cells *Inhal Toxicol.*, 2019, 31(4), 161–166. doi: 10.1080/08958378.2019.1624896
14. Zhang C., Cui F., Zeng G.M. et al. Quaternary ammonium compounds (QACs): a review on occurrence, fate and toxicity in the environment *Sci Total Environ*, 2015, 518–519, 352–362. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.007
15. Lucas A.D. Environmental fate of polyhexamethylene biguanide *Bull Environ Contam Toxicol.*, 2012, 88, 322–325. doi: 10.1007/s00128-011-0436-3
16. Conidi D., Andalib M., Andres C., et al. Modeling quaternary ammonium compound inhibition of biological nutrient removal activated sludge *Water Sci Technol.*, 2019, 79(1), 41–50. doi: 10.2166/wst.2018.449
17. Nishihara T., Okamoto T., Nishiyama N. Biodegradation of didecyldimethyl ammonium chloride by a strain of *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge *J Appl Microbiol.*, 2000, 88(4), 641–647. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01007.x
18. Russell A.D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon *J Hosp Infect.*, 2004, 57(2), 97–104. doi: 10.1016/j.jhin.2004.01.004
19. Воротникова А.В., Турнаева Е.А. Влияние поверхностно-активных веществ на систему «активный или - сточная вода» *Известия вузов. Инвестиции. Строительство. Недвижимость*, 2018, 8 (3), 78–87. doi: 10.21285/2227-2917-2018-3-78-87
20. Hajaya M.G., Tezel U., Pavlostathis S.G. Effect of temperature and benzalkonium chloride on nitrate reduction *Bioresour. Technol.*, 2011, 102, 5039–5047. doi: 10.1016/j.biortech.2011.01.080
21. Tumah H.N. Bacterial Biocide Resistance *J Chemother.*, 2009, 21(1), 5–15. doi: 10.1080/1120009X.2009.12030920
22. Agnelo L., Leonel L.P., Silva N.B. et al. Effects of wastewater disinfectants on the soil: Implications for soil microbial and chemical attributes *Sci Total Environ.*, 2020, 706, 136007. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.136007
23. Espigares E., Bueno A., Fernández-Crehuet M., Espigares M. Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants *J Hosp Infect.*, 2003, 55, 137–140. doi: 10.1016/s0195-6701(03)00238-x
24. Fernandez-Crehuet M., Espigares M., Moreno E., Espigares E. Specificity of the neutralizers as the cause of errors in evaluating disinfectant efficacy: an assessment of triclosan *Lett Appl Microbiol.*, 2013, 57, 517–525. doi: 10.1111/lam.12142
25. Шестопапов Н.В., Акимкин В.Г., Федорова Л.С., Серов А.А., Скопин А.Ю. Способ определения чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующим средствам. Патент RU 2650760, опубл 17.04.2018 Бюл. № 11
26. Герасимов В.Н., Бондарева Л.Ю., Болдырев М.В., Киселева Н.В., Дятлов И.А. Дезинфицирующее средство для заправки бытовых аэрозольных баллончиков для обеззараживания воздушной среды и поверхностей в помещениях. Патент RU 0002646816, 07.03.2018
27. Fernandez-Bayo J.D., Toniato J., Simmons B.A., Simmons C.W. Structure and activity of thermophilic methanogenic microbial communities exposed to quaternary ammonium sanitizer *J Environ Sci (China)*, 2017, 56, 164–168. doi: 10.1016/j.jes.2016.10.005
28. Pereira M.A., Pires O.C., Mota M., Alves M.M. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge *Biotechnol. Bioeng.*, 2005, 92, 15–23. doi: 10.1002/bit.20548

29. Timofeeva L.M., Kleshcheva N.A., Moroz A.F., Didenko L.V. Secondary and Tertiary Polydiallylammonium Salts: Novel Polymers with High Antimicrobial Activity *Biomacromolecules*, 2009, 10, 2976–2986. doi: 10.1021/bm900435v
30. Ширяева Е.А. Ворончихина Л.И. Кинетика гидролиза четвертичных солей аммония в супрамолекулярных системах на основе поверхностно-активных веществ *Современные наукоемкие технологии*, 2006, 4, 83–84.
31. Ismail Z.Z., Tezel U., Pavlostathis S.G. Sorption of Quaternary Ammonium Compounds to Municipal Sludge *Water Res.*, 2010, 44, 2303–2313. doi: 10.1016/j.watres.2009.12.029
32. Литти Ю.В., Сердюков Д.В., Канунников О.В., Аксельрод В.А., Лойко Н.Г. Переработка законсервированных фекальных отходов с использованием анаэробного сбраживания *Экология и промышленность России*, 2020, 24 (10), 33–37. doi: 10.18412/1816-0395-2020-10-33-37

Antimicrobial Properties of a Biocide Based on Quaternary Ammonium Compounds plus Polyhexamethylene Guanidine and Possible Methods of Its Deactivation

Yu.V. LITTI^{*}, D.V. SERDYUKOV¹, O.V. KANUNNIKOV², V.A. AKSELROD², and N.G. LOYKO¹

¹ *Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071, Russia*

² *Ecotol Service LLC, Moscow, 105005, Russia*

*e-mail: litty-yuriy@mail.ru

Received May 21, 2020

Revised June 26, 2020

Accepted November 15, 2020

Abstract—Biocidal agents (BA) are widely used in environmentally safe toilet complexes (ESTC) of passenger railcars to suppress microbial activity in faecal sludge (FS). Subsequent disposal of BA-containing FS at municipal sewage treatment facilities adversely affects their work due to the loss of activated sludge. The antimicrobial properties of BA, based on quaternary ammonium compounds (QAC) and polyhexamethylene guanidine (PHMG), as well as methods for its neutralization, have been studied. It was confirmed that BA based on QAC and PHMG has an antimicrobial effect on various groups of bacteria, reducing their number by 10–100 or more times. It was found that FS contains two groups of microorganisms with different sensitivity to BA. Methods for deactivation of the BA antimicrobial action in FS were tested using: (1), a deactivating agent; (2), incubation with thermophilically digested wastewater sludge as a source of the microbial methanogenic community; and (3), chemical deactivation by acidification or alkalization. The highest efficiency was shown by the method of deactivation of BA via thermophilic anaerobic digestion with pretreatment of FS with a strong acid

Key words: biocide, faecal sludge of ESTC of passenger railcars, antimicrobial activity, quaternary ammonium compounds, polyhexamethylene guanidine, deactivator, methanogenic microbial community

Funding—This work was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-115-126