

# UV-desinfeksjon av vann

## I. Innvirkning på mikroorganismer/virusforhold som kan begrense bruken av UV-stråler som desinfeksjonsmiddel.

Av Erik Skipperud Johansen og Jan Aug. Myhrstad

Erik Skipperud Johansen er sivilingeniør fra Norges Tekniske Høgskole 1977, Linjen for Teknisk Fysikk. Han har siden juli 1977 vært engasjert ved Statens Institutt for Folkehelse (SIFF).

Jan Aug. Myhrstad er cand.real fra Universitetet i Oslo 1965, med kjemi som hovedfag. Han er sjefingeniør og avdelingsleder ved SIFF.

### INNLEDNING

Klor og klorforbindelser har i årtier vært de mest brukte desinfeksjonsmidler.

Etter som behovet for desinfeksjon av drikkevann ble påtrengende her i landet, har desinfeksjonsanlegg blitt installert. I flere tilfelle er vann av relativt dårlig fysikalsk-kjemisk kvalitet blitt klorert. Ved en rekke vannverk er klor-doseringsanlegg montert relativt nær forbruksområdet. Disse forhold har ført til at klor og dets forbindelser er kommet i miskreditt på grunn av de organoleptiske problemer kloreringen har medført.

I de senere år er det funnet at klorering av humusholdig vann kan føre til dannelsen av karsinogene forbindelser som kloroform og beslektede trihalometaner (1, 2, 3). Dette har skapt en viss usikkerhet vedrørende bruken av klor og klorforbindelser i drikkevannsbehandling.

Ultrafiolette (UV)-stråler har bakteriedrepende effekt. Dette har vært kjent i lengere tid, og UV-stråler har i en årrekke vært benyttet som desinfeksjons-

middel i næringsmiddelindustrien og til sterilisering av luften i laboratorier på sykehus hvor patogene mikroorganismer/virus kan forekomme. Det er stråling i det fjerne UV-området ( $< 300$  nm) som øver størst stråleskade på mikroorganismer/virus (4,5). Inaktiveringen er størst ved 260 nm, og øker med økende energidose (6, 7).

På vannverksiden fikk UV-desinfeksjon sitt gjennombrudd i 1975-76. Dette skyldtes egentlig nye kostholdsforskrifter for skip som ble gjort gjeldende fra 1974, og hvor andre desinfeksjonsmidler enn hypokloritt skulle godkjennes av Helse-direktoratet. Ved Sanitær-kjemisk avdeling på Statens Institutt for Folkehelse (SIFF) ble UV-apparatene underkastet en omhyggelig undersøkelse som et ledd i godkjenningsordningen. Det ble også gjort forsøk (1974) som viste at vann av relativt dårlig fysikalsk-kjemisk kvalitet ble tilfredsstillende desinfisert, basert på en vurdering av forekomsten av indikatororganismer før og etter bestråling.

UV-desinfeksjon bør utføres så nær forsyningsområdet som mulig, da metoden har en momentan baktericid virkning. Da organoleptisk vannkvalitetsforringelse ikke inntreffer ved UV-bestråling, og UV-stråledosen for drikkevannsdesinfeksjon er for liten til å påvirke vannets kjemiske sammensetning, fremtrer UV-desinfeksjon som et meget attraktivt alternativ til klordesinfeksjon ved en rekke vannverk her i landet. UV-desinfeksjon nyttes på en rekke skip og off-shore installasjoner. Et prosjekt som er gjennomført på Sanitærkjemisk avdeling ved SIFF viser at UV-desinfeksjon også kan nyttes for avløpsvann. Resultatene fra dette prosjektet vil bli publisert i nær fremtid.

Det har vært nødvendig å få belyst UV-strålers virkning på mikroorganismer/virus og forhold som kan begrense effekten og brukbarheten av UV-stråler som

desinfeksjonsmiddel for vann. Det er her også tatt i betraktning utslipp av UV-bestrålt avløpsvann oppstrøms et vannverks-inntak hvor vannverket benytter UV-desinfeksjon.

Foreliggende artikkel er et sammen- drag av en rapport om UV-strålers inn- virkning på mikroorganismer/virus og forhold som kan begrense bruken av UV-stråler til desinfeksjon av vann publi- sert av Sanitær-kjemisk avdeling ved SIFF i november 1977.

### UV-INDUSERTE SKADER I MIKRO- ORGANISMER OG VIRUS

UV-skade kan være:

- letal, dvs. skaden medfører celledød eller
- subletal, dvs. skaden er ikke kritisk mph. cellens livsfunksjon.

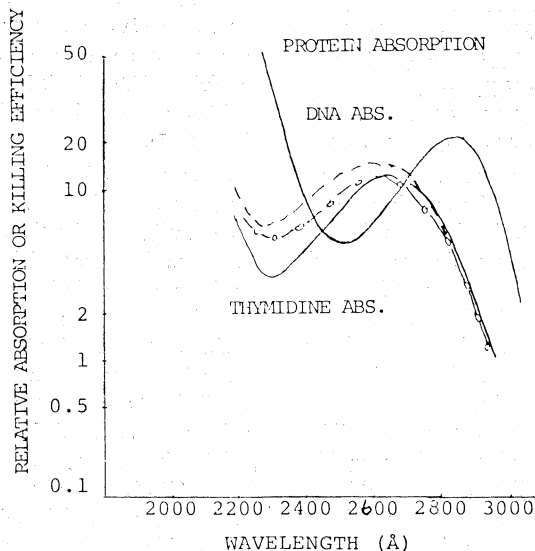


Fig. 1. Spektret for UV-inaktivering av *E. coli* H/r (o—o) og absorpsjonsspektra for *E. coli* DNA, tymidin og proteinet tryptin.

Hvorvidt skaden er letal eller ikke, avhenger både av hvor skaden er lokalisert og hvor effektiv reparasjon av UV-skade er.

UV-stråler induserer skader i protein, nukleinsyrer og komponenter av disse (6, 8).

*Proteinskader* oppstår når det dannes kryssbindinger og/eller S-S-brudd (S-S: svovelbinding). Hvis proteinets aromatiske aminosyrer og svovelgrupper absorberer UV-stråling, kan det dannes kryssbindinger og/eller S-S-brudd (5, 9). Skadene er vanligvis av subletal karakter.

I bakterier og virus er livsfunksjonen knyttet til nukleinsyrer (RNA- og DNA forbindelser). UV-induserte skader i *nukleinsyrene* er kritiske med hensyn på letalitet (4, 6, 10, 11). Absorpsjon av stråling f.eks. i DNA fra *E-coli* har vist

å korrelere med inaktiveringsspektret for denne bakterie (9), se fig. 1.

Purin- og pyrimidinbaser absorberer det meste av UV-lyset ved 260 nm. Energiabsorpsjon er årsak til dannelsen av pyrimidindimerer (PD). PD er et fotoprodukt som oppstår ved kopling mellom to pyrimidinbaser. PD utgjør hovedgruppen av UV-induserte fotoprodukter, ca. 70—90%, og kan medføre delvis eller total deformasjon av DNA eller RNA (11, 12). Dimerer dannes i avgrensede områder av DNA (13).

Dimerutbyttet er avhengig av UV-dosen, og utbyttet øker med økende dose. Forsøk med *E-coli* har vist at en UV-dose på 10.000  $\mu$ Ws/cm<sup>2</sup> kan gi et dimerutbytte på ca. 0,2% av den totale tyminmengden i bakteriecellen (14).

Tabell 1 viser de UV-energi som trengs for å indusere tymin-dimerer i ulike DNA-molekyler (9, 15).

Tabell 1: Dimerutbyttet (tymindimerer) i ulike DNA-molekyl

Microorganism/virus	<i>E-coli</i>	<i>Haemophilus Influenzae</i>	T2-fag	PM2-fag
Weight of DNA-molecule (dalton)	2,8·10 <sup>9</sup>	6·10 <sup>6</sup>	1,3·10 <sup>8</sup>	6·10 <sup>6</sup>
Thymine dimers pr. DNA-molecule	1	1	1	35
UV-energy $\mu$ Ws/cm <sup>2</sup>	1	500	25	50 000

*Sekundære skader* opptrer ofte som en følge av UV-induserte primærskader. Dannelse av sekundære skader krever gjerne høye UV-doser (9).

De viktigste sekundære skader er kort omtalt nedenfor.

#### 1. DNA-trådbrudd (- enkelt og dobbelt)

Enkeltrådbrudd dannes lettere enn dobbeltrådbrudd ved en gitt UV-dose. Dobbelttrådbrudd kan oppstå når skader på motsatte DNA-tråder overlapper (16). Dobbelttrådbrudd medfører uvilkarlig celledød (4).

## 2. Hydratisering.

Hydrater er funnet i DNA-molekyler som en følge av UV-bestråling (8). Hydratiseringen er mer uttalt i enkelt- enn i dobbeltrådet DNA. Hydrater kan indirekte forstyrre DNA-replikasjonen.

## 3. Kryssbindinger.

Intermolekylære kryssbindinger kan oppstå mellom (9)

- DNA —DNA tråder
- DNA og protein
- RNA og protein.

Dannelse av kryssbindinger krever relativt små UV-doser.

## 4. Cellulære forandringer.

Av slike bør nevnes (8)

- a nedsatt DNA-syntese, antagelig p.g.a. UV-induserte dimerprodukter
- b nedsatt RNA- og proteinsyntese
- c nedsatt celledeling og kromosomforstyrrelser antagelig p.g.a. protein-skader.

## UV-RESISTENS

De samme typer og den samme mengde stråleskader blir induisert i både UV-resistente og UV-følsomme mikroorganismer/virus (6).

Mikroorganismer/virus er motstandsdyktige overfor UV-bestråling dersom:

- a DNA ligger godt beskyttet (som f.eks. hos bakterie- og soppspor)er)
- b DNA-mengden er liten og begrenset (som f.eks. i virus)
- c de har evne til reparasjon av stråleskade (primært i DNA).

Graden av stråleresistens er i hovedsak avhengig av hvor effektiv reparasjon

av stråle-skaden er, dvs. UV-resistensen avhenger av genotypen (14).

Reparasjon skjer ved hjelp av foto-reakivering og /eller mørkereparasjon i et bestemt tidsrom (ofte 60—100 min.) etter UV-bestråling. Fotoreaktivering er avhengig av lys i det synlige/nære UV-området, er enzymatisk betinget og mer effektiv ved høy enn ved lav temperatur (17, 18). Mørkereparasjon foregår uavhengig av lys. Mørkereparasjon deles i «pre- og postreplikasjon» (19, 20). Begge styres av kompliserte multienzymatiske systemer. Prereplikasjon fjerner UV-induserte dimerprodukter (tymindimerer) i nukleinsyrene før DNA-replikering og fyller på med nye nukleotider. Postreplikasjon skjer etter DNA-replikering og reparerer skade ved genetisk rekombinasjon. Postreplikasjon er genetisk uavhengig av pre-replikasjon. Forstyrrelser i de gener som styrer postreplikasjon er kritiske med hensyn på reparasjon av UV-skade (21).

Hvis pre- eller postreplikasjoner m.h.t. noen skader overlapper med reparasjon av andre skader, vil reparasjonsprosessen kunne forstyrres (22, 23). Slike forstyrrelser kan medføre replikasjonsfeil som antas å være årsak til mutasjonsdannelse (23, 24).

Evnen til reparasjon av UV-skade varierer fra en art mikroorganisme/virus til en annen og mellom stammer/mutanter innen den enkelte art. (25).

Tabell 2 viser frekvensen av noen UV-induserte skader (her: antall fotoprodukter pr. midlere letale dose, LD<sub>50</sub>-dosen) i en UV-resistent og en UV-følsom mutant av *E-coli* B (26). Av tabellen ser en at det skal en større skadefrekvens (ca. en faktor 100 — 200) til for en viss letal skade i den resistente *E-coli* B/r sammenlignet med den UV-følsomme *E-coli* B<sub>s-1</sub>.

Tabell 2. Antall ulike DNA-skader induisert ved UV-bestråling (254 nm) av *E. coli* og T-2 bakteriofag i vannløsning med en fraksjon overlevende celler på 37% (dvs. LD<sub>37</sub>-dosen).

Estimates of the numbers of photoproducts in DNA per mean lethal dose for irradiation at 254 nm in aqueous solution. (Table 1. Setlow. Courtesy Pergamon Press.)

Product	T2 phage	<i>E. coli</i>	
		resistant (B/r)	sensitive (B <sub>s-1</sub> )
Interstrand cross-links	< 10 <sup>-2</sup>	2	< 10 <sup>-2</sup>
Chain breaks	< 10 <sup>-2</sup>	2	< 10 <sup>-2</sup>
DNA-protein links†	—	3	10 <sup>-2</sup>
Cyclobutane dimers	10	10 <sup>3</sup>	10
Hydrates	~ 1	10 <sup>2</sup>	~ 1

Note that the molecular weight of *E. coli* DNA is about 20 times that of phage DNA

Tabell 3 gir en oversikt over de UV-energien som kreves for å inaktivere noen utvalgte mikroorganismer (27). Energien er målt i luft ved 100% transmisjon. De

mest stråleresistente bakterier i denne tabellen er *Sarcina Lutes* og *Micrococcus sphaeroides*. *Saccharomyces* er den mest UV-resistente gjærtypen.

Tabell 3: Energi nødvendig for 90 og 100% UV (254 nm)-inaktivering av ulike mikroorganismer.

Bakterier	Energi $\mu\text{WS}/\text{cm}^2$	
	90%	100%
<i>Sarcina lutes</i>	19700	26400
<i>B. subtilis</i> spores	11600	22000
<i>Micrococcus sphaeroides</i>	10000	15400
<i>S. typhimurium</i>	8000	15200
<i>Streptococcus lactis</i>	6150	8800
<i>Micrococcus candidus</i>	6050	12300
<i>B. subtilis</i>	5800	11000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5500	10500
<i>Bacillus anthracis</i>	4520	8700
<i>Phytomonas tumefaciens</i>		8500
<i>Neisseria catarrhalis</i>	4400	8500
<i>S. enteritidis</i>	4000	7600
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3500	6600
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	3370	6500
<i>B. paratyphosus</i>	3200	6100
<i>Escherichia coli</i>	3000	6600
<i>Proteus vulgaris</i>	3000	6600
<i>B. megatherium</i> sp. (spores)	2730	5200
<i>Staphylococcus aureus</i>	2600	6600
<i>Serratia marcescens</i>	2420	6160
Dysentery bacilli	2200	4200
<i>Streptococcus hemolyticus</i>	2160	5500

Eberthella typosa	2140	4100
Streptococcus viridans	2000	3800
Staphylococcus albus	1840	5720
Shigella paradysenteriae	1680	3400
<i>Gjær:</i>		
Saccharomyces sp.	8000	17600
Saccharomyces ellipsoides	6000	13200
Saccharomyces cerevisiae	6000	13200
Common yeast cake	6000	13200
Bakers yeast	3900	8800
Brewers' yeast	3300	6600

Superresistente mikroorganismer/virus er ikke kjent (28).

Den mest UV-resistente mikroorganisme antas å være bakterien *Micrococcus Radiodurans* (29). En UV-inaktivering på 99,9% for disse bakterieceller krever en minimumsdose på 200.000 $\mu$ Ws/cm (8).

Fraksjonert bestråling kan gjøre mikroorganismer/virus mer UV-resistente hvis

- de enkelte energidoser er mindre enn letalitetetsdosen
- det gis mulighet til reaktivering mellom hver UV-dose.

Forsøk med *E-coli* mutanter med forskjellig evne til reaktivering har vist at antallet overlevende celler øker når tidsrommet mellom hver bestråling øker (30).

#### ANDRE FAKTORER SOM ER BESTEMMENDE FOR UV-INKTIVERINGEN

Foruten UV-resistens vil UV-inaktivering til en viss grad være avhengig av enkelte biologiske og fysisk/kjemiske faktorer.

Av biologiske faktorer bør i denne sammenheng nevnes cellevekst.

Det er funnet at celler i eksponentiell vekstfase gjennomgående er lettere å inaktivere enn celler i stasjonær vekstfase (31). Grunnen er at DNA-syntesen, som

skjer når cellene er i eksponentiell vekstfase, forstyrrer reparasjon av UV-skade og derved gjør cellene mer UV-følsomme.

Ulike komponenter (inhomogeniteter) i et medium kan absorbere eller skjerme for strålingen, og derved gjøre UV-desinfeksjon lite effektiv. UV-stråler kan ha nedsatt penetrasjonsevne i vann. Spesielt vann som inneholder mye organisk materiale (humus), suspendert stoff (leire, silt, alger, jern- og aluminiumhydroksyde) vil absorbere UV-energi (32). Selv destillert vann reduserer UV-intensiteten (33). Absorpsjonen er større jo mer turbid vannet er, og UV-transmisjonen avtar med økende lysvei i mediet.

#### OPPSUMMERING OG DISKUSJON

Artikkelen har kort belyst UV-induserte skader (primære- og sekundære) i mikroorganismer/virus, forhold som bevirker UV-resistens og ellers kan redusere effekten av UV-stråler i vannbehandlingen.

Effekten av UV-desinfeksjon er primært avhengig av størrelsen på energidosen og øker med økende energidose. For å sikre en viss inaktivering (f.eks. 99,9%) av de mest UV-resistente mikroorganismer/virus må UV-dosen være betryggende i ethvert punkt av bestrålingskammeret.

Mest mulig av UV-energien, som lampene utstråler, bør treffe de tilstedeværende mikroorganismer/virus, og minst mulig bør absorberes i mediet. UV-desinfeksjon må derfor ofte sees i sammenheng med annen vannbehandling. Ved optimal UV-behandling bør mest mulig av vannets innhold av suspendert og løst materiale, som påvirker UV-transmisjonen, fjernes før bestråling. UV-transmisjonen bør med jevne mellomrom kontrolleres. Hvis transmisjonen fortsatt er dårlig, kan dette kompenseres ved å øke UV-anleggets stråledose. I praksis gjøres dette ved å øke bestrålingstiden når UV-lampen(e)s intensitet er konstant.

Reaktivering av UV-skadede mikroorganismer/virus vil kunne redusere effekten

av UV-stråler i vannbehandlingen. Så langt forholdene tillater bør man ved ytre tiltak redusere mulighetene for reaktivering. I første rekke gjelder dette fotoreaktivering. Denne kan hindres f.eks. ved å beskytte det UV-behandlede vann mot sollys 1 — 2 timer i innebygde tanker, basseng, rør eller lignende.

Så langt denne undersøkelsen viser, kan UV-stråler egne seg godt som desinfeksjonsmiddel, selv for vann typer med høyt humusinnhold. Anvendelsesmulighetene bør forøvrig vurderes ut fra vannkvalitet og den øvrige vannbehandling. Nyttets UV-desinfeksjon på vannverk, fordres forsvarlig drift og vedlikehold av vannledningsnettet.

#### REFERANSELISTE

1. *Bellar, T. A. Lichtenberg, J. J. og Kroner, R. C.:* J. Am. Water Worsk Assoc. 66, 703 — 706, 1974.
2. *Rook, J. J.:* «Formation of haloforms during chlorination of natural waters» (Water Treatment and Examination 23, 2 : 234, 1974).
3. *Stevens A. A. et al.:* «Chlorination of Organics in drinking water» (Journ. AWWA nov. 1976).
4. *Dertinger, H. og Jung, H.:* «Molecular radiation biology» (Heidelberg Sci. Library, 12, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1970).
5. *Brock, T. D.:* «Biology of microorganisms» (2.ed., Prentice-Hall, Inc., Englewood cliffs, New Jersey, 1974).
6. *Leach, W. H.:* «Biological aspects of ultraviolet radiation. A review of hazards» (US. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service. Environmental Health Service Reprod. by National Technical information service, Springfield, Va., 22151, 1970).
7. *Smith, K. C. og Hanawalt, P. C.:* «Molecular photobiology» (New York: Academic Press, 1969).
8. *Kiefer, J.:* «Ultraviolette Strahlen» (Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1977).
9. *Florkin, M. og Stotz, E. H.:* «Comprehensive biochemistry» (Photobiol., Ionizing Radiations, 27, Elsevier publishing Company, Amsterdam, London, New York, 1967).
10. *Meistrich, M. L., Lamola, A. A. og Gabbay, E.:* «Sensitized photoinactivation of bacteriophage T4» (Photochem. and photobiol., 11, 169 — 178, 1970).
11. *Setlow, J. K.:* Current Topics in Radiat. Res., edit. by M. Ebert, Amsterdam, North Holland 2, 195, 1966.
12. *Ranade, S. S., Avadhani, N. G. og Rege, D. V.:* «Effects of non-ionizing and ionizing radiations on the transforming ability of E-coli DNA» (Photochem. and photobiol., 19, 103 — 108, 1974).

13. *Minton, K. og Friedberg, E. C.*: «Evidence for clustering of pyrimidine dimers on opposite strands of UV-irradiated bacteriophage DNA» (*Radiat. Biol.*, 26 (1), 81 — 85, 1974).
14. *Sedliaková, M., Masek, F. og Bernátova, L.*: «Relationship between survival and thymine dimer excision in ultravioletirradiated *E. coli*.» (*Photochem. and photobiol.*, 14, 597 — 605, 1971).
15. *Veldhuisen, G., Bacchetti, S. og Van der Valk, M. J.*: «The effect of irradiation with ultraviolet light on the sedimentation behaviour of PM2 DNA» (*Photochem. and photobiol.*, 23, 205 — 208, 1976).
16. *Brookes, P. og Lawley, P. D.*, (*Biochem. J.*, 80, 469 — 503, 1961).
17. *Jagger, J., Takebe, H. og Snow, J. M.*: «Photoreactivation of killing in *Streptomyces*: action spectra and kinetic studies», (*Photochem. and photobiol.*, 12, 185 — 196, 1970).
18. *Setlow, J. K.*: «Photorepair of biological systems», *Research progress in organic biological and medical chemistry*, 3, (1), 1972. Ed. U. Gallo og L. Santamaria, North Holland, publ. comp., Amsterdam, London.
19. *Sedliaková, M., Billen, D. og Bruns, L.*: «A study of the relationship between survival and repair synthesis of DNA after ultraviolet light exposure», (*Photochem. and photobiol.*, 11, 309 — 317, 1970).
20. *Smith, K. C.*: «Dark repair of DNA damage», *Research progress in organic biological and medicinal chemistry*, 3 (1), 1972. Ed. by U. Gallo og L. Santamaria, North-Holl. publ. company, Amsterdam, London.
21. *Horii, Z. I. og Suzuki, K.*, «Degradation of the DNA of rec — A mutants of *E. coli* K-12 after irradiation with ultraviolet light. Further studies including a rec-A uvr-A double mutant», (*Photochem. and photobiol.*, 11, 99 — 107, 1970).
22. *Sedgwick, S. G.*: «Inducible error-prone repair in *Escherichia coli*», (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 2753 — 2757, 1973).
23. *Doudney, C. O.*: «Complexity of the ultraviolet mutation frequency response curve in *Escherichia coli* B/r: SOS induction, one-lesion and two-lesion mutagenesis». (*Journ. of Bact.*, 128 (3), 815 — 826, 1976).
24. *Sedgwick, S. G.*: «Misrepair of overlapping daughter strand gaps as a possible mechanisms for UV-induced mutagenesis in uvr strains of *Escherichia coli*: A general model for induced mutagenesis by misrepair (SOS repair) of closely spaced DNA-lesions» (*Mut. Res.*, 41, 185 — 200, 1976).
25. *Christensen, Ebbe, A.*, Statens Seruminstitut, Amager Boulevard 80, 2300 København S. (Priv. meddelelse 1977).
26. *Setlow, R. B.*: «Photoproducts in DNA irradiated in vivo» (*Photochem. and photobiol* 7, 643 — 649, 1968).
27. *Ek, Ivan*, firmaet Raydar AB, Frötallsgatan 8, 421 32 Västre Frölunda, Sverige. (Privat meddelelse 1977).
28. *Schenck, Günther O.*, Institut für Strahlenchemie im Max-Planck Institut für Kohlenforschung, Mühlheim a.d. Ruhr, Tyskland. (Privat meddelelse 1977).
29. *Seeberg, Erling*. Forsvarets forskningsinstitut, Kjeller, Lillestrøm. (Privat meddelelse 1977).
30. *Bomura, T. og Smith, K. C.*: «Quantitative evidence for enzymatically induced DNA double strand breaks as lethal lesions in UV-irradiated pol + and pol A1 strains of *E. coli* K-12» (*Photochem and photobiol.*, 22, 243 — 248, 1975).
31. *Gundersen, Wenche Blix*, Bakteriologisk Institutt, Rikshospitalet, Oslo (Privat meddelelse 1977).
32. *Chambers, C. W. og Clarke, N. A.*: «Control of bacteria in nondomestic water supplies», (*Adv. appl. microbiol.*, 8, 105 — 143, 1966).
33. *Laurence, C. A. og Bloch, S. S.*: «Disinfection, sterilization and preservation», (*Lea & Febrieger, Philadelphia*, 1968).