

Оригинальные статьи / Original articles

<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2023-2-70-74>
УДК 632.934:632.38/.4

В.О. Рудаков^{1,2},
В.Л. Баранов³, А.А. Ткачев^{3*}

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии»
143050, Россия, Московская область,
Одинцовский район, р.п. Большие Вяземы,
ул. Институт, владение 5

² ООО «АгроБиоТехнология»
125212, Россия, г. Москва, Кронштадский
бульвар, д. 7, стр. 4, помещение V, офис 43

³ ООО НПО «ЛИТ»
141701, Россия, Московская обл., г.
Долгопрудный, Лихачевский проезд, д. 25

*Автор для переписки: tkachev@npo.lit.ru

Конфликт интересов: несколько авторов
работают в компании, производящей
оборудование для УФ-обеззараживания.

Вклад авторов: Рудаков В.О. – дизайн исследова-
ния, сбор данных и микробиологические
исследования, подготовка статьи, Баранов
В.Л. – дизайн исследования, техническое обес-
печение, анализ данных, Ткачев А.А. – замысел
исследования, редактирование статьи.

Для цитирования: Рудаков В.О., Баранов В.Л.,
Ткачев А.А. Оценка эффективности обеззара-
живания ультрафиолетом (254 нм) водных рас-
творов от фитопатогенных микроорганизмов.
Овощи России. 2023;(2):70-74.
<https://doi.org/10.18619/2072-9146-2023-2-70-74>

Поступила в редакцию: 02.02.2023

Принята к печати: 14.03.2023

Опубликована: 03.04.2023

Valery O. Rudakov^{1,2},
Victor L. Baranov³, Andrey A. Tkachev^{3*}

¹ Federal State Budget Scientific Institution
«All-Russian Research Institute of hytopathology»
st. Institute, property 5, Bolshie Vyazemy, Russia
Odintsovsky district, Moscow region,
143050, Russia

² AgroBioTechnology LLC
Kronshtadsky boulevard, 7/4, room V, office 43,
Moscow, 125212, Russia

³ LLC "LIT"
Likhachevskiy proezd, 25, Dolgoprudniy,
Moscow region, 141701, Russia

*Corresponding Author: tkachev@npo.lit.ru

Conflict of Interest: Several authors work for
a company that manufactures UV disinfection
equipment.

Authors' contribution: Rudakov V.O. – study
design, data collection and analysis, article prepa-
ration, Baranov V.L. – study design, technical sup-
port, data analysis, Tkachev A.A. – idea of study,
article editing.

For citations: Rudakov V.O., Baranov V.L.,
Tkachev A.A. Evaluation of the effectiveness of
ultraviolet disinfection (254 nm) of aqueous solu-
tions from phytopathogenic microorganisms.
Vegetable crops of Russia. 2023;(2):70-74. (In
Russ.) <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2023-2-70-74>

Received: 02.02.2023

Accepted for publication: 14.03.2023

Published: 03.04.2023

Оценка эффективности обеззараживания ультрафиолетом (254 нм) водных растворов от фитопатогенных микроорганизмов



Резюме

Актуальность. В настоящее время тепличные комплексы используют воду для полива из открытых поверхностных источников (прудов, озер, рек) и подземную воду из скважин, добавляя в нее возвратный (дренажный) раствор. При этом вода как из открытых источников, так и дренажный раствор, часто становится источником появления и распространения в теплицах фитопатогенной инфекции, приносящей экономически значимые потери урожая. В связи с этим необходимость разработки гарантированных методов и способов обеззараживания дренажной воды и воды открытых источников является актуальной. Одним из методов обеззараживания воды является применение ультрафиолетового облучения, но для эффективного применения облучения необходимо обеспечение минимальной эффективной УФ-дозы, характерной для данного возбудителя.

Результаты. Была проведена работа по экспериментальному установлению доз УФ-облучения, которые позволяют обеспечить полную инактивацию вегетативных клеток и спор бактерий и грибов (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Phoma destructiva*), находящихся в растворе, приготовленном на основе дистиллированной воды. Доза УФ-облучения 40 мДж/см² обеспечила полную инактивацию бактериального возбудителя, а доза 60 мДж/см² показала полную инактивацию возбудителей исследованных грибных инфекций.

Ключевые слова: теплицы, фитопатогенные микроорганизмы, грибы, бактерии, обеззараживание, ультрафиолет

Evaluation of the effectiveness of ultraviolet disinfection (254 nm) of aqueous solutions from phy- topathogenic microorganisms

Abstract

Relevance. Currently, greenhouse complexes use water for irrigation from open surface sources (ponds, lakes, rivers) and underground water from wells, adding a return (drainage) solution to it. At the same time, water from both open sources and drainage solution often becomes a source of emergence and spread of phytopathogenic infection in greenhouses, which brings economically significant crop losses. In this regard, the need to develop guaranteed methods and methods for the disinfection of drainage water and water from open sources is relevant. One of the methods of water disinfection is the use of ultraviolet irradiation, but for the effective use of irradiation, it is necessary to ensure the minimum effective UV dose. This UV dose is typical for each pathogen.

Results. Work was carried out to experimentally establish doses of UV irradiation that allow complete inactivation of vegetative cells and spores of bacteria and fungi (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*, *Phoma destructiva*) in a solution prepared on the basis of distilled water. A dose of UV irradiation of 40 mJ/cm² ensured complete inactivation of the bacterial pathogen, and a dose of 60 mJ/cm² showed complete inactivation of the pathogens of the studied fungal infections.

Keywords: greenhouses, phytopathogenic microorganisms, fungi, bacteria, disinfection, ultraviolet

Введение

Болезни растений возникают как в старых теплицах с накопившимися очагами инфекции, так и в новых теплицах без инфекции [1]. В чистых обеззараженных теплицах одним из основных источников возникновения болезней является вода (в случаях забора из внешних открытых источников), а возвратный дренажный раствор часто становится распространителем-умножителем попавших в единичном количестве патогенов. В тепличных комплексах по выращиванию овощных культур – огурец, томат, салат, баклажан и др. к этим источникам добавляется семенная инфекция, а в теплицах цветочных культур – рассада и черенки. Фитосанитарное состояние семян, черенков и рассады обычно сложно установить по внешним признакам. Заметные внешние признаки могут проявиться даже при хорошем уходе только в период вегетации: на однолетних овощных и цветочных культурах в фазе цветения, а на многолетних цветочных – на третьем году или даже позже.

В частности, проблема с инфицированными черенками связана с тем, что при их заготовке традиционно принимается представление, по которому одревесневшие ветки 1–2 года не должны быть инфицированы. Даже в случае видимой зараженности корней и старых веток прикорневой части стебля считается, что инфекция не успевает распространиться в ветки возраста 1 и 2 года. Однако наши фитопатологические анализы убеждают, что такие случаи встречаются и это не является редкостью. Типичными бывают зараженности вертициллезом, фузариозом и бактериозом, реже в ветках 1 и 2 года встречается возбудитель инфекционного ожога (*Coniothyrium*) [2].

При переносе укорененных черенков и рассады в теплицу инфицированными могут оказаться единичные растения, но удержать проявление инфекции на уровне единичного случая обычно не удается. За период от 1 до 3 лет патогенные грибы активизируются, прорастают и распространяются мицелием и спорами с возвратным дренажным раствором и спорами по воздуху, заражая другие растения. По теплице разносятся также с каплями воды при орошении, на режущих поверхностях инструментов при обрезке, а также и другими способами.

Анализы дренажной воды, прошедшей через систему очистки (песчаные и механические фильтры и зарубежная установка ультрафиолетового облучения), показывают, что в существующей производственной практике используемые установки не обеспечивает ожидаемого эффекта. Надежное обеззараживание достигается только от живых клеток (бактерий, не образующих спор, и мицелия грибов), а споры спорообразующих бактерий и грибов проходят и сохраняют жизнеспособность – содержание в разных случаях варьирует, часто оставаясь на опасном для растений уровне.

Полное обеззараживание всегда наблюдали только после фильтрации методом обратного осмоса или добавления пестицидов в питающий раствор. Защитный эффект применения фунгицида имеет ограничения во времени, и требуется постоянное добавление для поддержания эффекта, иначе через некоторое время после прекращения подачи его в раствор заболевания возобновляются.

Подробных анализов причин проявления в теплицах пониженной практической эффективности обеззараживания растворов методом УФ-облучения до настоящего времени в литературе встречено не было.

Задачей исследования являлось определения эффективных доз УФ-облучения для надежного снижения содержания в поливном водном растворе фитопатогенов, обычно встречающихся в теплицах, ниже уровня, приводящего к возникновению и распространению заболеваний. Пороговое значение содержания числа конидий в 1 г субстрата для возможного заражения, например, корневыми фузариозными гнилями, находится на уровне 15–20 конидий/грамм воздушно сухого субстрата, а экономически значимый порог в открытом грунте приближается к 1×10^3 конидий/г [3]. При этом опыт показывает, что титр конидий 15–20 конидий/г в теплице будет несущественным на первом этапе попадания в раствор (первом обороте раствора), но даже в одном зараженном растении произойдет инкубация патогена, и на втором этапе (обороте раствора) титр вырастает в 10, а иногда в 100 раз.

Принцип УФ-обеззараживания основан на необратимых повреждениях ДНК и РНК микроорганизмов. Главную роль при этом играет образование тиминовых и пиримидиновых димеров, которые разрушают структуру ДНК и РНК, делая невозможным размножение микроорганизма. Кроме того, при УФ-облучении образуются межнитевые сшивки и однонитевые разрывы молекул ДНК. Отмечается повреждение РНК в бактериях, в результате чего происходит замедление или прекращение синтеза активных белков (ферментов). При воздействии УФ на структурные белки наиболее вероятным являются повреждение клеточных мембран.

Устойчивость разных типов микроорганизмов к УФ-излучению варьируется значительно: от низкой устойчивости живых бактерий в вегетативной форме до высокоустойчивых спор и вирусов. Более того, окружающая микроорганомы среда сильно влияет на дозу облучения. Для того чтобы УФ-энергия стала эффективной против микроорганизма, квант ультрафиолета должен поглотиться ДНК, РНК или белком, находящимся внутри клетки микроорганизма. Например, при равной дозе облучения грамположительные бактерии с толстой капсулой протоплазмы оказываются намного устойчивее, чем грамотрицательные бактерии с тонкой капсулой.

Основной характеристикой процесса УФ-обеззараживания, определяющей степень снижения количества микроорганизмов данного типа в процессе облучения, является произведение интенсивности излучения – I (мВт/см²) и времени облучения – t (с). Произведение называется дозой облучения – D (мДж/см²). Доза облучения определяет количество энергии ультрафиолетового излучения, сообщаемое микроорганизмам.

Зависимость количества неповрежденных клеток описывается уравнением:

$$\frac{N}{N_0} = e^{-kD},$$

где N_0 – количество микроорганизмов до облучения, N – количество микроорганизмов после облучения УФ-излучением с дозой облучения D , k – стандартная константа чувствительности микроорганизма к воздействию УФ-излучения. Величина k зависит от вида микроорганизма.

Данное уравнение является хорошим первым приближением, описывающим инактивацию микроорганизмов в зависимости от приложенной дозы облучения.

Основной исходной задачей при выборе УФ-оборудования является определение эффективной дозы УФ-излучения, достаточной для обеззараживания вод до требуемых уровней микробиологических показателей [4].

Для проведения модельных опытов использовали коллекцию фитопатогенных грибов и бактерий, распространенных в закрытом грунте. В экспериментах испытывали 5 наиболее характерных представителей патогенного комплекса, встречающихся в современных тепличных хозяйствах, различающихся по морфологии и особенностям паразитирования на растениях:

Представитель оомицетов. *Pythium debaryanum*. Распространяется и сохраняется в водной среде гидропонной культуры и во влажной почве. Поражает и разрушает внутренние ткани корней.

Представители несовершенных конидиальных. *Fusarium oxysporum* и *Verticillium dahliae*. Распространяются во всех видах субстрата – почве, торфе, кокосовом волокне и минеральной вате. Заражают растения через корни. Развиваются во внутренних тканях корней и сосудистой системе растений и прорастают от корня по стеблю до плодов, вызывают увядание растений и способны привести к гибели. Споры сохраняются в субстрате и в семенах.

Представитель пикнидиальных. *Phoma destructiva*. Споры переносятся по воздуху и с дренажным раствором. Инфекция сохраняется на поверхностях теплицы. Паразитирует в тканях листьев и плодов. Споры сохраняются в семенах.

Представитель бактерий, не образующих спор. Грамотрицательная аэробная подвижная палочка *Agrobacterium tumefaciens*. Сохраняется в водной среде, распространяется с дренажным раствором. Чаще всего встречается при гидропонном выращивании культур. Паразитирует во внутренних тканях растений. Вызывает образование корончатых галл у растений в закрытом грунте.

Методика исследований

Испытывали устойчивость микроорганизмов к УФ-воздействию методом облучения водной суспензии спор 4 видов отобранных грибов и 1 неспорообразующей бактерии.

Для проведения экспериментов готовили рабочий раствор методом смыва стерильной дистиллированной водой спор с колонии испытываемых видов грибов, вырастающих на поверхности твердой питательной среды (агаре Чапека). Жидкую культуру бактерии выращивали в 0,5% жидкой среде дрожжевого экстракта.

УФ-облучению подвергали водную суспензию рабочего раствора микроорганизмов с титром $= 1 \times 10^3$ клеток/мл. Эта концентрация значительно превышает реальное содержание любого фитопатогена в дренажных водах теплиц даже при самой неблагоприятной ситуации (по нашим наблюдениям, титр содержания фитопатогенных микроорганизмов в растворе обычно от 1-2 до 100 конидий/мл раствора). Титр рабочего раствора контролировали методом подсчета микроорганизмов в камере Горяева. Число КОЕ/мл устанавливали методом посева суспензии раствора с микроорганизмами после облучения на селективные агаризованные микробиологические среды (среда Чапека

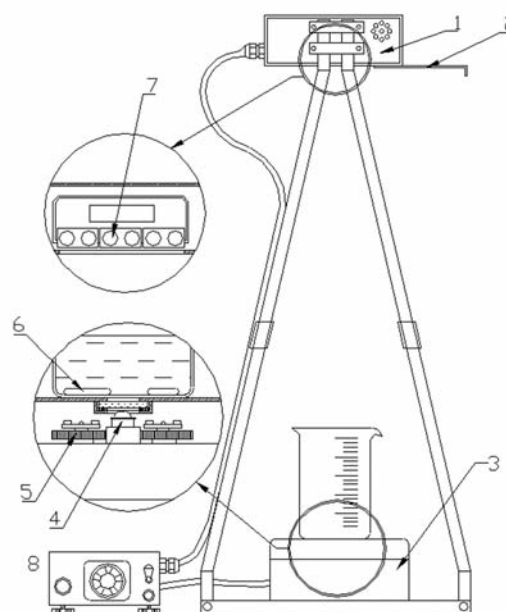


Рис. 1. Прибор модельного УФ-облучения «ПИКЧ»

1 – ламповый блок; 2 – заслонка; 3 – блок перемешивания; 4 – фотоприемник; 5 – магнитные мешалки; 6 – магниты; 7 – УФ-лампы; 8 – блок питания

Fig. 1. Device for model UV irradiation "PIKCH"

1 – lamp block; 2 – damper; 3 – mixing block; 4 – photodetector; 5 – magnetic stirrers; 6 – magnets; 7 – UV lamps; 8 – power supply

и агаре с дрожжевым экстрактом).

УФ-облучения производили с использованием компактного лабораторного прибора ПИКЧ (рис. 1), разработанного НПО «ЛИТ». Он позволяет определять зависимость степени обеззараживания облучаемой воды от дозы УФ-облучения и проводить измерения коэффициента пропускания воды на длине волны 254 нм [5]. Чувствительность микробиологического показателя к УФ-облучению определяется по результатам измерений его величины в пробах воды, облученных различными дозами УФ-излучения.

В приборе выбрана непроточная схема с полным перемешиванием жидкости с помощью магнитных мешалок. При этом заданная УФ-доза обеспечивается выбором соответствующего времени облучения источником ультрафиолета постоянной мощности. В приборе за счет полного перемешивания достигается равномерное облучение всей тестируемой жидкости. Для контроля абсолютной интенсивности УФ-излучения имеется специальный фотоприемник. Его калибровка осуществляется источником стабильного излучения, прошедшим метрологическую поверку в лаборатории Госстандарта.

Проводили по три серии облучения различными УФ-дозами. Пробы для микробиологического анализа до и после облучения отбирали из каждого варианта по 1 мл и 0,1 мл. Пробу переносили в чашку Петри с агаром Чапека (для грибов) и агаром дрожжевого экстракта (для бактерий) в 5 повторностях. Контроль – проба, отобранная до облучения.

Оценивали устойчивость микроорганизмов к УФ-облучению методом подсчета вырастающих колоний на агаровой среде (агаре Чапека и агаре дрожжевого экстракта).

Результаты и их обсуждение

Результаты проведенных экспериментов приведены в таблицах 1-5.

Таблица 1. Влияние УФ-облучения водной суспензии спор гриба *Verticillium dahliae* на инактивацию микроорганизма
Table 1. Effect of UV irradiation of an aqueous suspension of spores of the fungus *Verticillium dahliae* on microorganism inactivation

№	Доза УФ-облучения, мДж/см ²	Концентрация, КОЕ/мл				LOG инактивации
		Серия 1	Серия 2	Серия 3	Среднее, ±σ	
1	0	271	147	149	189±71	-
2	20	28	0,6	4	11±15	1,2
3	40	2	0,2	0	0,7±1,1	2,4
4	60	0	0	0	0	>3,5
5	100	0	0	0	0	>3,5
6	150	0	0	0	0	>3,5
7	250	0	0	0	0	>3,5

Таблица 2. Влияние УФ-облучения водной суспензии спор гриба *Fusarium oxysporum* на инактивацию микроорганизма
Table 2. Effect of UV irradiation of an aqueous suspension of spores of the fungus *Fusarium oxysporum* on microorganism inactivation

№	Доза УФ-облучения, мДж/см ²	Концентрация, КОЕ/мл				LOG инактивации
		Серия 1	Серия 2	Серия 3	Среднее, ±σ	
1	0	139	137	130	135±5	-
2	20	3,2	7,8	3,4	4,8±3	1,5
3	40	0	2	0	0,7±1,2	2,3
4	60	0	0	0	0	>3,3
5	100	0	0	0	0	>3,3
6	150	0	0	0	0	>3,3
7	250	0	0	0	0	>3,3

Таблица 3. Влияние УФ-облучения водной суспензии спор гриба *Phoma destructiva* на инактивацию микроорганизма
Table 3. Effect of UV irradiation of an aqueous suspension of *Phoma destructiva* spores on microorganism inactivation

№	Доза УФ-облучения, мДж/см ²	Концентрация, КОЕ/мл				LOG инактивации
		Серия 1	Серия 2	Серия 3	Среднее, ±σ	
1	0	110	140	90	113±25	-
2	20	93	79	84	85±7	0,1
3	40	12	10	10	11±1,1	1,0
4	60	0	0	0	0	>3,2
5	100	0	0	0	0	>3,2
6	150	0	0	0	0	>3,2
7	250	0	0	0	0	>3,2

Таблица 4. Влияние УФ-облучения водной суспензии споромицелиальной массы гриба *Pythium debaryanum* на инактивацию микроорганизма
Table 4. Effect of UV irradiation of an aqueous suspension of the sporomycelial mass of the fungus *Pythium debaryanum* on the inactivation of the microorganism

№	Доза УФ-облучения, мДж/см ²	Концентрация, КОЕ/мл				LOG инактивации
		Серия 1	Серия 2	Серия 3	Среднее, ±σ	
1	0	113	92	50	85±32	-
2	5	2,6			2,6	1,5
3	10	0,2			0,2	2,6
4	15	0			0	>2,6
5	20	0		5,0	2,5±4	1,5
6	40	0	5,2	0	1,7±3	1,7
7	60		0	0	0	>3,0
8	80	0			0	>2,6
9	90		0		0	>2,6
10	100			0	0	>2,6
11	150		0	0	0	>3,0
12	250		0	0	0	>3,0
13	300		0		0	>2,6

Таблица 5. Влияние УФ-облучения водной суспензии бактерий *Agrobacterium tumefaciens* на инактивацию микроорганизма
Table 5. Effect of UV irradiation of an aqueous suspension of bacteria *Agrobacterium tumefaciens* on microorganism inactivation

№	Доза УФ-облучения, мДж/см ²	Средняя концентрация, $\pm\sigma$ КОЕ/мл	LOG инактивации
1	0	910 $\pm$ 102	-
2	15	704 $\pm$ 82	0,1
3	20	15 $\pm$ 9	1,8
4	30	0,2 $\pm$ 0,4	3,7
5	40	0	>3,7
6	100	0	>3,7
7	150	0	>3,7

В ходе лабораторных экспериментов с модельными растворами, содержащими фитопатогенные микроорганизмы (споры грибов *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum*, *Phoma destructiva* и *Pythium debaryanum*, а также бактерии *Agrobacterium tumefaciens*), установлены дозы УФ-облучения, которые позволяют обеспечить полную инактивацию вегетативных клеток бактерий и грибов, а также их спор, находящихся в растворе, приготовленном на основе дистиллированной воды.

Эффективная доза УФ-облучения 60 мДж/см² обеспечивает полную инактивацию изученных источников грибной фитопатогенной инфекции в исследованных пробах, что соответствует более чем 99,9%-ному сни-

жению (LOG 3) содержания его спор в растворе.

Эффективная доза УФ-облучения 40 мДж/см² позволила обеспечить полную инактивацию фитопатогенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* в исследованных пробах, что практически соответствует 99,99%-ному снижению (LOG 4) содержания его спор в растворе.

При выборе УФ-оборудования для обеззараживания используемой для полива оборотной дренажной воды и воды открытых источников необходимо дополнительно учитывать физико-химические свойства обрабатываемой воды, а также конструктивные особенности применяемого УФ-оборудования для обеспечения требуемой эффективной УФ-дозы.

Об авторах:

Валерий Олегович Рудаков – кандидат биол. наук, заведующий лабораторией фитопатологии ООО «АгроБиоТехнология»

Виктор Львович Баранов – начальник технологического отдела, ООО НПО «ЛИТ»

Андрей Анатольевич Ткачев – заместитель генерального директора по маркетингу, ООО НПО «ЛИТ», автор для переписки, tkachev@npolit.ru

About the Authors:

Valery O. Rudakov – Cand. Sci. (Biology),

Head of the Laboratory of Phytopathology, AgroBioTechnology LLC

Victor L. Baranov – Head of the Technology Department, LLC "LIT"

Andrey A. Tkachev – Deputy General Director for Marketing, LLC "LIT", Correspondence Author, tkachev@npolit.ru

• Литература

1. Ахатов А.К., Ганнибал Ф.Б., Мешков Ю.И., Джалилов Ф.С., Чижов В.Н., Игнатов А.Н., Полищук В.П., Шевченко Т.П., Борисов Б.А., Стройков Ю.М., Белашапкина О.О. *Болезни и вредители овощных культур и картофеля*. М.: КМК, 2013.
2. Рудаков В.О. Роза на гидропонике. Фитопатологические проблемы при производстве роз на срезку в теплицах и возможности их решения с применением биопрепаратов. *Гавриш*. 2015;(2):46-47.
3. Экономические пороги вредоносности вредителей, болезней и сорных растений в посевах сельскохозяйственных культур: справочник. М.: ФГБНУ «Росинформагротех», 2016.
4. Кармазинов Ф.В., Костюченко С.В., Кудрявцев Н.Н., Храменков С.В., редакторы *Ультрафиолетовые технологии в современном мире*. Долгопрудный: Интеллект; 2012.
5. Васильев С.А., Ахмадеев В.В., Волков С.В., Якименко А.В. Технологическое обследование очистных сооружений канализации и выбор УФ-оборудования. *Водоснабжение и санитарная техника*. 1999;(4):16-20.

• References

1. Akhatov A.K., Gannibal F.B., Meshkov Yu.I., Dzhalilov F.S., Chizhov V.N., Ignatov A.N., Polishchuk V.P., Shevchenko T.P., Borisov B.A., Stroykov Yu.M., Beloshapkina O.O. *Diseases and pests of vegetables and potatoes*. Moscow: KMK, 2013. 463 p. (In Russ.)
2. Rudakov V.O. Hydroponic rose. Phytopathological problems in the production of cut roses in greenhouses and the possibility of their solution using biological products. *Gavrish*. 2015;(2):46-47. (In Russ.)
3. Karmazinov F.V., Kostyuchenko S.V., Kudryavtsev N.N., Khramenkov S.V. (eds.) *Ultraviolet technologies in the modern world*. Dolgoprudny: Intellect; 2012. (In Russ.)
4. Economic thresholds of harmfulness of pests, diseases and weeds in crops: a reference book. Moscow: FGBNU "Rosinformagrotech", 2016, 76 p. (In Russ.)
5. Vasiliev S.A., Akhmadeev V.V., Volkov S.V., Yakimenko A.V. Technological inspection of sewage treatment facilities and selection of UV equipment. *Water Supply and Sanitary Engineering*. 1999;(4):16-20. (In Russ.)