

# 用于消毒监测的新型生物指示剂

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

祝庆荃 袁洽勳 胡桂兰 何来英

**提要** 用可溶性基质制备出含活菌为  $10^5 \sim 10^6$  CFU/片的7种细菌繁殖体和细菌芽孢菌膜, 同时对各种菌膜的稳定性及重复性进行了观察, 并应用这些菌膜对几项消毒措施的效果进行了监测, 初步认为菌膜的制备、保存、稳定性及重复性方面均优于“试验布片”。

**关键词** 消毒 生物指示剂

评价一种消毒措施质量的优劣, 可用物理、化学、生物学等手段进行检测, 然而能直接反映灭菌过程对微生物的杀灭作用, 仍首推生物学方法, 其它测定法都应以生物学培养结果为标准。

生物学监测一直采用五十年代从苏联引进的“试验布片”法<sup>[1~5]</sup>, 但由于布片吸水程度不同, 染菌量不一致, 染菌布片不能长时间保存, 制备标准很难统一, 因而导致试验结果难以进行横向对比, 重复性不佳, 给推广应用造成一定的困难。

我们在染菌布片的基础上, 研制出一种可溶性基质, 制备了含各种测试消毒效果的代表菌株的菌膜, 用于检查各种消毒因子处理后的效果检定, 并且对菌膜的特点、稳定性进行了观察。

## 材料与方法

受试菌株我们采用白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus* 8032)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) 粪链球菌 (*Streptococcus faecium* ATCC 19581)、枯草杆菌芽孢黑色变种 (*B. subtilis* var. *niger* ATCC 9372)、短小杆菌芽孢 (*B. pumilus* E601)、蜡状杆菌芽孢 (*B. cereus* SSI, C<sup>1</sup>/1)、嗜热脂肪杆菌芽孢 (*B. stearothermophilus* SSI, K31)。

将四种芽孢杆菌接种于TGY琼脂(含豚豚0.5%、消旋葡萄糖0.1%、酵母浸液0.3%、琼脂1.8%)、除嗜热脂肪芽孢杆菌培养于56℃、3~5天外, 其余三种芽孢均在37℃下培养2~5天, 用蒸馏水洗下菌苔, 共洗三次, 于4℃冰箱保存。三种细菌繁殖体均用普通琼脂在37℃下培养24小时, 菌苔用0.03M磷酸缓冲液洗下, 置4℃冰箱内保存备用, 芽孢和繁殖体均为第四代培养物。

将可溶性基质与适当菌液混匀后, 以50微升一滴加于无菌聚乙烯膜上, 37℃温箱内干燥后, 将大小为0.5cm<sup>2</sup>的菌膜收集于玻璃瓶中, 4℃冰箱保存。以10倍递减稀释法作活菌计数, 计算出每片菌膜含菌量用菌落形成单位(CFU)/片表示。

## 结 果

一、菌膜间含菌量的差异: 用可溶性基质制备的菌膜含细菌繁殖体为  $8.4 \times 10^5 \sim 8.0 \times 10^6$  CFU/片; 芽孢为  $4.4 \times 10^5 \sim 5.1 \times 10^6$  CFU/片。以白色葡萄球菌菌膜为例, 经29次试验共检查菌膜159片, 包括操作技术的误差在内, 每片间活菌数的误差率在10%以下占检查菌膜总数的87.9%。

二、菌膜活菌的回收: 按比例配制成的菌膜液与干燥后的菌膜分别进行活菌数比较及t测验, 证明制膜和干燥过程对以上几种细菌存

活影响不大, 均无显著性差异。除蜡状杆菌芽孢回收率稍低(65.86%)以外, 其余各种菌膜的回收率均在80%以上, 高者达98.65%(表1)。

三、菌膜的稳定性: 对保存于室温(18~20℃)和冰箱(4℃)的白色葡萄球菌菌膜, 每周作活菌计数, 共进行13周的观察, 证明冰箱

表 1 6 种菌膜活菌回收情况

菌 种	制膜前 (CFU/50μl) $\bar{X} \pm SD$	干燥菌膜 (CFU/片) $\bar{X} \pm SD$	t 测检	回收率 (%)
白色葡萄球菌	$8.35 \times 10^6 \pm 0.2$	$7.73 \times 10^6 \pm 0.55$	$P < 0.2 > 0.1$	92.57
金黄色葡萄球菌	$1.45 \times 10^6 \pm 0.2$	$1.17 \times 10^6 \pm 0.15$	$P < 0.5 > 0.4$	80.68
枯草杆菌芽孢黑色变种	$5.22 \times 10^6 \pm 0.14$	$5.13 \times 10^6 \pm 0.15$	$P > 0.5$	98.65
蜡状杆菌芽孢	$4.64 \times 10^6 \pm 0.28$	$3.03 \times 10^6 \pm 1.1$	$P < 0.2 > 0.1$	65.86
短小杆菌芽孢	$6.52 \times 10^6 \pm 0.28$	$5.47 \times 10^6 \pm 0.5$	$P < 0.1 > 0.05$	84.15
嗜热杆菌芽孢	$7.53 \times 10^6 \pm 0.42$	$6.88 \times 10^6 \pm 0.55$	$P < 0.4 > 0.2$	91.73

内保存的菌膜较室温保存的更为稳定, 历时三个月后每片菌膜中的活菌数仍保持在  $10^6$ CFU 以上。金黄色葡萄球菌于 4℃ 下保存三个月后活菌数略有下降的趋势。芽孢保存于冰箱中活菌数亦无明显的变化(表2)。

箱保存者为  $1.2 \times 10^2$ CFU, 有96~98%的活菌衰亡或损失。

表 2 5 种菌膜的稳定性比较

菌 种	保存 时间 (周)	每片菌膜含活菌数 (CFU/片)	
		制备时 $\bar{X} \pm SD$	保存后 $\bar{X} \pm SD$
白色葡萄球菌	13	$7.73 \times 10^6 \pm 0.55$	$1.51 \times 10^6 \pm 0.3$
金黄色葡萄球菌	12	$1.17 \times 10^6 \pm 0.15$	$1.04 \times 10^6 \pm 0.15$
枯草杆菌芽孢 黑色变种	25	$5.13 \times 10^6 \pm 0.15$	$1.72 \times 10^6 \pm 0.54$
短小杆菌芽孢	8	$5.47 \times 10^6 \pm 0.5$	$4.13 \times 10^6 \pm 1.02$
蜡状杆菌芽孢	8	$3.03 \times 10^6 \pm 1.1$	$1.83 \times 10^6 \pm 0.72$

四、菌膜在消毒监测上的应用: 我们对各种菌膜除用于化学液体消毒剂的定性检测外, 还进行了以下方面的监测。

1. 对紫外线消毒的监测: 用UVR-254型紫外线强度计测定, 并调节照射距离到所需照射强度, 将菌膜置于无菌平皿中暴露于不同照射强度下, 计算其杀灭率(表3)。

表 3 紫外线照射对各种菌膜的杀灭率

菌 种	照射强度 ( $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ )	照射时间 (分)	杀灭率 (%)
白色葡萄球菌	45	2	99.95
白色葡萄球菌	45	5	99.99
金黄色葡萄球菌	50	6	99.57
金黄色葡萄球菌	50	8	99.98
金黄色葡萄球菌	70	4	99.96
金黄色葡萄球菌	100	3	99.98
枯草杆菌芽孢黑色变种	135	60	99.99

金黄色葡萄球菌菌膜在7500ppm石炭酸作用下其抵抗力不低于制膜前的菌液。在60℃环境中菌膜与菌液的稳定性相同。用枯草杆菌芽孢黑色变种制备的菌膜经四周保存对二氯异氰尿酸钠的抵抗力均为7500ppm, 30分钟。金黄色葡萄球菌菌膜对7500ppm石炭酸需24~26分钟, 保存五周后其抗力不变。

2. 对微波消毒的监测: 将菌膜分别放到  $16 \times 16 \times 8$  cm大小敷料包中部, 外用湿毛巾包裹, 在输出功率为650W微波作用下, 白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌及粪链球菌于4分钟内死亡, 嗜热杆菌芽孢需10分钟作用后才能全部杀死。

用  $1 \times 10^6$ CFU/ml 白色葡萄球菌菌液, 按 0.01ml/片染菌量, 制备的  $0.5 \times 1.0$ cm 大小的“试验布片”, 活菌计数为  $3 \times 10^3$ CFU/片, 于室温保存一周后, 每片为  $0.7 \times 10^2$ CFU, 冰

3. 对高压蒸气灭菌的监测: 因菌膜遇水即溶化, 在高压蒸气灭菌时将菌膜分别放到无

菌空试管中，置于欲消毒的物品中部，消毒后将液体培养基倒入菌膜管中然后培养，结果证明15磅20分钟可杀灭白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪链球菌、枯草杆菌芽孢、蜡状杆菌芽孢及短小杆菌芽孢，而嗜热脂肪杆菌芽孢却需增加到20磅或延长到30分钟才能灭活。

4. 对气体消毒剂消毒效果的监测：将菌膜分别置于无菌平皿中，在体积为0.15m<sup>3</sup>木箱和9立升干燥缸内进行气体消毒试验（室温20℃；相对湿度80%）选用10%戊二醛，剂量1.06ml/立升，作用40小时后对白色葡萄球菌、粪链球菌及蜡状杆菌、短小杆菌、嗜热脂肪杆菌的三种芽孢有杀灭作用。用0.05ml/立升福尔马林经22小时作用，除对以上五种细菌繁殖体和芽孢有杀灭作用外，并对金黄色葡萄球菌和枯草杆菌芽孢也有灭活作用。我们还应用26克/m<sup>3</sup>酸氯作烟熏消毒试验，作用30分钟对白色葡萄球菌杀灭32%；1小时后可达77%。

根据上述实验结果证明用可溶性基质制备的菌膜作生物指示剂，对紫外线、微波、高压蒸气及气体消毒剂的消毒效果测定是适用的。

### 讨 论

菌膜系采用可溶性基质制备，遇水即可溶化，在液体中形成均匀的菌悬液，除用于消毒效果的检查外，还可用于消毒实验研究的定量分析。

为保证消毒试验的可靠性，试验中需采用一定的菌量，根据顾德鸿的材料<sup>[6]</sup>认为每张菌片以含1×10<sup>8</sup>个细菌最为合适，我们按这个菌量制备可溶性菌膜，对白色葡萄球菌、金黄色葡萄球菌菌膜（保存于4℃冰箱中）进行了三个

月的观察，证明每片菌膜活菌数仍然维持在10<sup>8</sup>这一水平。枯草杆菌芽孢保存六个月，其活菌数也无显著变化，保证了在一定时间内有恒定的菌量用于消毒试验。

因菌膜含活菌数稳定，重复性良好，且受温度条件及保存时间的影响甚微，生产制备程序简单，易于工业化成批生产，为消毒监测标准化创造了前提，可使消毒试验进行横向及纵向对比，避免每次试验需自行制备“试验布片”造成标准不统一的弊病。

#### A New Biological Indication Used in the Surveillance of Disinfection Zhu Qingquan, et al., Institute of Epidemiology & Microbiology, CAPM, Beijing

The bacteria film containing viable bacteria 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup>CFU/piece of 7 species of bacteria with and without spores were prepared by using a soluble substance. We observed that the stability and the reproducibility of above bacteria films and had a surveillances of the effect on several disinfection measurements by using these films. The data showed that this bacterium film is better than "experimental pieces of cloth" in the preparation, storage, stability and reproducibility.

**Key words** Disinfection Biological indication

### 参 考 文 献

1. B.И.БАЛЛИКОB著。消毒灭虫除鼠指南。第一版。北京：人民卫生出版社，1956：414~415。
2. 消毒杀虫灭鼠手册编辑组。消毒杀虫灭鼠手册。第一版。北京：人民卫生出版社，1980：162~163。
3. 薛广波主编。实用消毒学。第一版。北京：人民军医出版社，1985：80~81。
4. 阎力军，等。苯甲酸指示管监测高压蒸气灭菌器效果的研究。中华流行病学杂志 1986；7（4）：242。
5. 王瑛，等。化学消毒试验用芽孢指标菌的选择。消毒与灭菌 1984；1（2）：90。
6. 顾德鸿，等。消毒试验方法讲义。1984