

# 酸化电位水对微生物的杀灭效果及其作用机理的初步研究

李新武 孙守宏 李涛 李晓青 李秋丽 袁洽劼

**摘要** 酸(氧)化电位水是一种具有高氧化还原电位(ORP)、低pH值和氧化能力的水,在无有机物存在的条件下,作用15秒钟可杀灭细菌繁殖体,作用30秒钟可破坏乙型肝炎表面抗原的抗原性,作用10分钟可杀灭枯草杆菌黑色变种芽孢。酸化电位水在室温密闭避光等条件下保存三个星期以上,其ORP值和pH值没有明显改变,蒸馏水、生理盐水对其影响较小,而有机物、磷酸盐等对其影响较大。

在电镜下观察酸化电位水对细菌芽孢的作用情况,结果表明:作用5分钟可使细菌细胞膜通透性增强、细胞肿胀、内容物溢出以及一些超微结构改变。

**关键词** 酸化电位水 氧化还原电位 超微结构

**Preliminary Study on Microbiocide Effect and its Mechanism of Electrolyzed Oxidizing Water** Li Xin-wu, Sun Shou-hong, Li Tao, et al. Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206

**Abstract** Electrolyzed Oxidizing water (EO Water) is characterized by possessing higher oxidizing reduction potential (ORP), lower pH value and oxidizing potential. Under conditions of free organic matter, it was tested for microbiocide efficacy in laboratory. The results showed that EO Water could completely kill all of the staphylococcus aureus and E. coli within 15 seconds, while for completely killing of spores of Bacillus subtilis Var. niger it would take 10 min. When it was used to destroy the antigenicity of HBsAg, 30 seconds was needed. The ORP and pH values of EO water were not obviously changed when stored in room-temperature with, airtight and light-free conditions for three weeks. Distilled water and physiological saline had little influence on the ORP and pH value of EO Water, but organic matters and phosphates had greater influence upon the two values.

The ultrastructure of spores of Bacillus subtilis var. niger after exposure to EO Water was observed under transmission electronmicroscope and was compared with that of the non-disinfected spores. The results indicated that after exposure to EO Water for 5 min., an increase of permeability of the spore's outer coat, swollen cell, overflowing of the contents of the spores and change of ultrastructure of spores were noticed.

**Key words** Electrolyzed oxidizing water Oxidizing reduction potential Ultrastructure

酸化电位水是在自来水中加入 0.05% 氯化钠,通过离子隔膜电解,在阳极产生高氧化还原电位(ORP)、低pH值的水。这种

水具有氧化能力和较强的杀灭微生物作用,为了准确评价该水的消毒效果,我们观察了不同ORP值和pH值的酸化电位水对细菌、芽孢和HBsAg的消毒效果;各种溶液和有机物对该水的ORP值和pH值的影响;不同保存条件下,该水ORP值和pH值随时间的

变化情况；并初步观察了与该水作用后芽孢超微结构的变化。现将研究结果报告如下。

## 材料与方 法

### 一、材料：

1. 菌株：枯草杆菌黑色变种芽孢 ATCC 9372，金黄色葡萄球菌 ATCC 6538，大肠杆菌 ATCC 25922。

2. HBsAg：含量为 1mg/0.25ml，批号 9504，北京生化免疫试剂中心生产。

3. 酸化电位水：ORP 值 1126~1130mV，pH 2.6~2.7；其它不同 ORP 值和 pH 值的水用 1mol/L NaOH 调节而成。

4. 中和剂：A：0.5% 硫代硫酸钠，0.03% mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS)，pH 7.2~7.4 (用于定量杀菌试验)；B：0.50% 硫代硫酸钠，20.00% 小牛血清 0.02mol/L PBS，pH 7.2~7.4 (用于 HBsAg 抗原性破坏试验)。

5. 稀释液和试液：0.50% 吐温-80，0.03mol/L PBS，pH 7.2~7.4；HCl-水溶液，pH 2.6，ORP 值 521mV；磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液，pH 2.6，ORP 569mV。

6. ELISA 检测 HBsAg 试剂盒。

7. Water-Test pH 计。

### 二、方法：

1. 菌悬液的制备：按照卫生部编印的《消毒技术规范》将枯草杆菌黑色变种芽孢制成  $10^8$ cfu/ml 的芽孢悬液，将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌制成  $10^8$ cfu/ml 的菌悬液。

2. 定量杀菌试验：除取上述各种菌悬液 50 $\mu$ l 分别加入到含 5ml 酸化电位水、HCl-水溶液及缓冲液的试管中外，其余步骤均按《消毒技术规范》进行，试验均重复 3 次。

3. HBsAg 抗原性破坏试验：取 1mg/ml 含 5.00% 小牛血清的 HBsAg 溶液 6 $\mu$ l，加入到含 1.50ml 酸化电位水的试管内，混匀，作用至规定时间后，分别取 0.30ml 加入到含 0.30ml 中和剂的试管中，混匀，作用 10 分钟后，取 0.10ml 进行 ELISA 检测，每个样品平行做两孔，取其平均 OD 值，以 S/N < 2.1

作为 HBsAg 抗原性转阴的标准，试验重复 3 次。

4. 含不同物质的酸化电位水 ORP 值和 pH 值的测定方法：将蒸馏水、自来水、生理盐水、0.03mol/L PBS、小牛血清、蛋白胨，以不同比例与酸化电位水混合，并取样用 Water-Test pH 计测定其 ORP 值和 pH 值，每个样品平行测定 2 次，取其平均值。

5. 各种保存条件下，不同时间，酸化电位水的 ORP 值和 pH 值的测定方法：分别将该水保存在室温敞开、室温密闭、室温密闭避光和 4℃ 密闭条件下，于不同时间取样测定其 ORP 值和 pH 值，每个时间取平行样分别测定 2 次，取其平均值。

6. 电镜标本按常规方法在 Philips EM-400 型透射电镜下观察超微结构的变化<sup>[1]</sup>。

## 结 果

一、不同 ORP 值及 pH 值的酸化电位水对细菌的杀灭效果：在 20℃ 条件下，ORP 值为 1127mV、pH 值为 2.6 的酸化电位水，作用 15 秒钟，对金黄色葡萄球菌的杀灭率为 100.00%，随着 ORP 值的下降，pH 值的升高，其杀灭率有所下降，ORP 值为 810，pH 为 7.5 时，作用 15 秒钟，其杀灭率为 99.93%，但 ORP 值的下降对大肠杆菌的杀灭率没有明显改变，ORP 分别为 1120、1021、826 时其杀灭率均为 100.00%。对于枯草杆菌黑色变种芽孢，ORP 值为 1130mV、pH 值为 2.6 的酸化电位水，作用 10 分钟杀灭率为 100.00%，当上述两值分别为 1021mV 和 3.1 时，作用 20 分钟杀灭率降为 89.34%。当在芽孢悬液中加入 10.00% 小牛血清时，虽然 ORP 值和 pH 值仍为 1130 和 2.6，但在作用相同时间后，其杀灭率急剧下降至 19.50% (表 1)。

二、不同 ORP 值及 pH 值的酸化电位水对 HBsAg 抗原性的破坏效果：ORP 值为 1130mV、pH 值为 2.6 的酸化电位水，在室温条件下作用 30 秒，S/N 值为 1.0，当 ORP

值为 1 005mV、pH 值为 3.7 时,作用 60 秒, S/N 值为 1.0, 上述两种条件下均可达到消毒, 而将该水的 ORP 值及 pH 值调至

815mV 和 7.6 时, 4 个作用时间的 S/N 值均大于 280, 不能完全破坏 HBsAg 的抗原性, 见表 2。

表 1 不同 ORP 值和 pH 值的酸(氧)化电位水对枯草杆菌黑色变种芽孢的杀灭效果

ORP (mV)	pH	有机物浓度 (%)	作用不同时间(分)的杀灭率(%)				对照菌数 (cfu/ml)
			2	5	10	20	
1130	2.6	0	39.50	99.97	100.00	100.00	$1.15 \times 10^6$
1021	3.1	0	89.76	90.26	89.44	89.34	$9.50 \times 10^6$
1130	2.6	10	15.00	18.90	17.50	19.50	$2.00 \times 10^6$

表 2 不同 ORP 值及 pH 值的酸(氧)化电位水对 HBsAg 抗原性的破坏效果

ORP (mV)	pH		不同作用时间(秒)平均 OD 值及 S/N 值				阴性对照	阳性对照
			30	60	120	300		
1130	2.6	OD	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005	2.262
		S/N	1.000	1.000	1.000	1.000		
1005	3.7	OD	0.022	0.006	0.006	0.006	0.006	1.836
		S/N	3.670	1.000	1.000	1.000		
815	7.6	OD	1.813	1.730	1.701	1.731	0.006	1.948
		S/N	302.000	288.330	283.500	288.500		

三、不同溶液及酸化电位水对细菌繁殖体和芽孢杀灭效果的比较: 应用与酸化电位水相同 pH 值的 HCl-水溶液和缓冲液同繁殖体及芽孢作用, 测定其杀灭率, 结果发现, HCl-水溶液对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的杀灭率分别为 66.67% 和 79.82%, 而对枯草杆菌黑色变种芽孢的杀灭率仅为 1.06%, 缓冲液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和芽孢的杀灭率分别为 0.00%、39.47% 和 6.38%。由此可见, 酸化电位水的杀菌作用主要取决于氧化还原电位。

四、各种液体和有机物对酸化电位水 ORP 值和 pH 值的影响: 蒸馏水、自来水、生理盐水、0.03mol/L 的 PBS 与酸化电位水以不同比例混和后, 测定其 ORP 值和 pH 值。结果表明: 以蒸馏水、生理盐水的影响较小, 4 份蒸馏水或生理盐水与 6 份酸化电位水混和后, ORP 值仍大于 1 100mV, pH 值为 2.8。自来水和 0.03mol/L 的 PBS 对两值的影响较大, 在酸化电位水中加入小牛血清或

蛋白胨时, 酸化电位水的 ORP 值下降十分明显, 六种物质对酸化电位水的影响由小到大依次为: 蒸馏水、生理盐水、自来水、0.03mol/L PBS、小牛血清、蛋白胨。

五、不同保存方法, 不同保存时间对酸化电位水 ORP 值及 pH 值的影响: 分别将酸化电位水保存在室温敞开、室温密闭、4℃密闭、室温密闭避光四种条件下, 于不同时间测定其 ORP 值及 pH 值的动态变化。结果表明, 在室温敞开条件下, 该水的 ORP 值下降较快, 3 天后 ORP 值下降至 1 000mV 以下, 7 天后降到最低水平(450mV 左右), 而其它三种条件下, 两值均较稳定, ORP 值和 pH 值在 21 天内基本无改变。

六、芽孢超微结构的变化: 在透射电镜下, 未经酸化电位水作用的芽孢外壳完整, 内、外层层次分明, 皮质层光滑, 为电子透明区, 核区电子密度高, 均匀且边缘整齐。经酸化电位水作用 5 分钟后, 外壳层局部破裂, 层次消失, 核区欠规整, 电子密度高区缩小。

## 讨 论

近年来一些高效安全的消毒灭菌剂已得到了开发和应用<sup>[2]</sup>,酸化电位水的发明为我们提供了一种新的消毒手段,它具有高 ORP 值、低 pH 值和氧化能力,在无有机物存在的条件下,对细菌、病毒具有很强的杀灭能力,只要使用得当,在数十秒内,可迅速杀灭细菌繁殖体,破坏 HBsAg 的抗原性,10 分钟可杀灭芽孢,而且原料仅为自来水和少量的氯化钠,消毒完毕又还原成自来水,不留残毒,它既不会象重金属消毒药物和化学消毒剂引起变态反应,也没有毒性,对不锈钢基本无腐蚀作用,是一种高效、速效、安全、方便和经济的消毒方法。但是,有机物对其杀菌作用的影响十分明显。因此必须注意合理使用,例如,在医院中,各种器具、医护人员手、各种牙科器械,应当用它先做冲洗,除去各种有机物,然后浸泡消毒。用于牙科漱口液时,应多次漱口,除去唾液、痰液。用于创面、伤口也应多量反复冲洗,才能充分发挥其消毒作用,此外也可用于肉类食品加工及饮食服务业的消毒等。由于酸化电位水对铜、铝和碳钢有中度腐蚀作用(资料未显示),应慎用于此类金属材料物品的消毒。

酸化电位水在室温密闭或室温密闭避光的保存条件下,具有较好的稳定性,保存三个星期以上,其 ORP 值仍大于 1100mV, pH 值小于 2.7。我们曾在室温密闭避光的塑料桶中将 ORP 值为 1168mV、pH 值为 2.3 的酸化电位水保存 200 天,其 ORP 值仍为 1102mV, pH 值为 2.5。故可将该水保存于密闭的塑料桶内,供随时使用。

关于酸化电位水杀菌的机理,本研究初步作了电镜形态学观察,结果发现该水可改变细菌细胞膜的通透性,使细菌细胞肿胀、破裂、细胞内容物溢出以及超微结构的改变。日本的研究表明,酸化电位水进入细胞后主要阻碍酶的活性而起杀菌和杀病毒作用(资料未发表)。关于酸化电位水的杀菌机理还有待今后进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 洪涛主编. 生物医学超微结构与电子显微镜技术. 北京: 科学出版社, 1984. 103.
- 2 Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Principles and Practice of Disinfection Preservation and Sterillization. Second Edition/Edided by AD Russell, WB Hugo and GAJ. Ayliffe Black Well Scientific Publications. 1992.

(收稿: 1995-11-20 修回: 1996-01-05)

## 从食物中毒患者粪便中检出布伦登芦普沙门氏菌

周爱荣 张安军

1993 年 7 月,甘肃农业大学技校 65 名师生在同一食堂聚餐后,发生食物中毒腹泻,并伴有不同程度的发热、恶心、呕吐、腹痛、腹泻、头痛等症状,来我院就诊。采集患者粪便接种 SS、麦康凯及中国兰琼脂平皿,37℃ 孵育 24 小时,菌落圆形、无色透明、湿润、边缘整齐,SS 琼脂平皿上菌落中心呈黑色。转种克氏斜面琼脂,经 37℃ 24 小时培养,上层斜面呈红色,底层黄色,有气体产生,动力阳性, H<sub>2</sub>S

阳性。枸橼酸盐、甲基红、鼠木糖、卫矛醇、阿拉伯糖、肌醇、蕈糖、赖氨酸、鸟氨酸、山梨醇均阳性;苯丙氨酸、尿素、侧金盏花、靛基质、VP 均阴性。采用卫生部兰州生物制品研究所生产的沙门氏菌诊断血清做玻片凝集, A-F 群 O 多价凝集, O 因子血清 6、7 凝集, H 抗原血清第一相抗原 e、h, 第二相抗原 e、n、z15 凝集, 盐水对照不凝。

经以上鉴定证实该菌符合伯杰手册新版 C 群布伦登芦普沙门氏菌。

(收稿: 1995-07-20 修回: 1995-08-25)