

· 论 著 ·

过氧乙酸复方消毒剂杀灭枯草杆菌芽孢的实验研究

曾宏逵¹, 谭伟龙², 钱万红², 朱元元¹, 季 昶¹, 曹根宝¹

[摘要] 目的 研究一种用于污染装备表面快速消毒的过氧乙酸复方消毒剂,并观察其杀灭枯草杆菌芽孢效果。方法 把两种消毒剂配制成不同浓度的复方,进行悬液定量杀芽孢、载体杀芽孢和模拟现场定量杀芽孢实验。结果 在室温下,四组复方对枯草杆菌芽孢均有一定的杀灭效果,A组复方以 500 mg/L 有效氯与 1000 mg/L 过氧乙酸混配而成,悬液定量杀菌时 10 min 的杀灭对数值达 7.74;载体定性杀菌时上述浓度 15 min 杀灭率达 100%;模拟现场试验时,作用 10 min 杀灭对数值达 4.20~6.40。结论 A组复方消毒剂对枯草杆菌芽孢达到了快速、高效的杀灭效果。

[关键词] 消毒;复方消毒剂;过氧乙酸;二氯二甲基海因;枯草杆菌;芽孢

中图分类号: R187.2; R517.9 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)02-0097-03

Observation of germicidal efficacy of compound peracetic acid disinfection solution

ZENG Hong-kui¹, TAN Wei-long², QIAN Wan-hong², ZHU Yuan-yuan¹, JI Chang¹, CAO Gen-bao¹. 1. 86 Clinical Branch of PLA, Dangtu, Anhui 243100, China; 2. Central of Diseases Prevention and Control of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China

[Abstract] **Objective** To study the germicidal efficacy of compound peracetic acid disinfection solution in killing spores of *Bacillus subtilis* var niger. **Methods** Two kinds of disinfectants were mixed into compound at certain ratio. The suspension quantitative germicidal test, carrier qualitative germicidal test and simulated field test were carried out. **Results** In the suspension quantitative germicidal test, the killing logarithms of spores of *Bacillus subtilis* var niger exposed to the solution containing 1000 mg/L peracetic acid and 500 mg/L available chlorine for 10 min was 7.74. In the carrier qualitative germicidal test, the germicidal efficacy was 100%. In simulated field test, the killing logarithms of spores of *Bacillus subtilis* var niger on steel tubes exposed to the solution containing 1000 mg/L peracetic acid and 500 mg/L available chlorine for 10 min was 4.20~6.40. **Conclusion** The compound disinfection solution of A group had a good germicidal efficacy in killing spores of *Bacillus subtilis* var niger.

[Key words] disinfection; compound disinfection solution; peracetic acid; dichlorodimethylhydan-toin; *Bacillus subtilis*; spore

过氧乙酸是一种高效消毒剂,对各种微生物均有较强的杀菌效果^[1],但因其较强的腐蚀性,实际应用中多使用其复方,以降低过氧乙酸的使用浓度并确保其杀菌效果^[2]。为应对突发公共卫生事件应急洗消的需要,我们研制了含过氧乙酸、二氯二甲基海因和其他助剂等成分的复方消毒剂,在实验室和模拟现场探讨了其对枯草杆菌芽孢的杀菌效果,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料 过氧乙酸为市售,有效含量为 15%~17%,二氯二甲基海因由某消毒剂厂提供,取上述两种消毒剂按不同有效含量混配配成 A、B、C、D 四种复方。试验菌为枯草杆菌黑色变种芽孢(ATCC 9372,由军事医学科学院提供)。不锈钢载体(直径 12 mm、厚 0.5 mm)、模拟现场试验用不锈钢管(围绕钢管口锯凹槽数条),经脱脂处理,压力蒸汽灭菌后,烤干备用。枯草杆菌黑色变种芽孢(以下简称枯草杆菌芽孢)的制备:将菌种分别接种于普通肉汤培养基管内,放入 37℃ 恒温箱中培养 24 h。吸取肉汤培养物 4~5 ml 转种于罗氏瓶普通琼

基金项目:南京军区“十一五”面上课题(07M108)

作者简介:曾宏逵(1956-),男,江苏建湖人,本科,主任医师,从事医院管理及研究工作

作者单位:1. 243100 安徽当涂,解放军 86 临床部;2. 210002 江苏南京,南京军区疾病预防控制中心

脂培养基上, 37℃ 培养 6 d。当镜检发现芽孢形成率超过 95% 时, 每个罗氏瓶用 10 ml 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗下芽孢, 以无菌纱布过滤于三角烧瓶内。将三角烧瓶置 45℃ 水浴箱中 24 h 进行芽孢断链。用 PBS 冲洗芽孢悬液 (3000 × g 离心, 每次 30 min) 2 次。将经洗涤的芽孢悬液放入 60℃ 水浴箱中 30 min, 以杀灭细菌繁殖体, 将芽孢液计数后放入 4℃ 冰箱备用。菌悬液和菌片的制备: 试验前, 用含 10 g/L 胰蛋白胍的 TPS 培养基制成菌悬液, 吸取部分菌悬液制作菌片, 部分菌悬液与有机干扰物 1:1 混匀备用^[3]。

1.2 实验方法

1.2.1 中和剂选择试验 试验分为 6 组, 以枯草杆菌芽孢为代表菌, 按悬液定量杀菌试验程序进行^[3,4]。

1.2.2 悬液定量杀菌实验^[4-5] 按每试管 4 ml 消毒液 (阳性对照为 TPS) 于 (20 ± 1)℃ 水浴中平衡温度 10 min, 加入 1 ml 菌悬液, 作用至预定时间, 吸取 0.5 ml 菌、药混悬液加入 4.5 ml 中和剂中, 混匀, 中和 10 min。混匀后吸取 1 ml 样液接种平皿, 倾注琼脂, 将平板置 37℃ 恒温箱培养, 72 h 后观察结果, 计数菌落数并计算杀灭对数值。

$KL = \lg N_1 - \lg N_2$ (KL : 杀灭对数值; N_1 : 对照组平均活菌浓度; N_2 : 实验组活菌浓度)

1.2.3 载体定性杀菌实验 在无菌平皿里按每片菌片 5.0 ml 的量加入消毒液 (阳性对照为硬水) 于 (20 ± 1)℃ 水浴中平衡温度 5 min, 用无菌镊子分别放入预先制备的菌片, 并使之浸透于消毒液中, 作用至预定时间, 用无菌镊分别将菌片移入一含 5.0 ml 中和剂肉汤试管中, 置 37℃ 恒温箱培养, 7 d 后观察结果。实验组无菌生长, 阳性对照组正常生长, 判定为灭菌合格。

1.2.4 模拟现场消毒实验 按每件载体 10.0 ml 的量加入消毒液 (阳性对照为硬水) 于 (20 ± 1)℃ 水浴中平衡温度 5 min, 将 40 个端部染有枯草杆菌芽孢悬液的不锈钢钢管分别浸没于消毒液中, 每个复配液试验 10 个样本, 作用至预定时间, 用无菌镊将

不锈钢钢管放于盛有 10.0 ml 中和剂溶液的小烧杯中, 中和 10 min, 混匀 (必要时用 TPS 稀释) 后, 吸取 1 ml 样液接种平皿, 倾注普通营养琼脂, 将平板置 37℃ 恒温箱培养, 72 h 后观察结果, 计数菌落数并计算杀灭对数值。

1.2.5 消毒效果的评价 参照国家卫生部《消毒技术规范》中的相关规定进行评价。

2 结果

2.1 中和剂选择试验结果 根据“中和剂选择试验”判别标准: 试验结果按第 1 组不长菌或菌落数远少于第 2 组; 第 2 组菌落数较第 1 组多, 但较第 3、4、5 组少; 第 3、4、5 组组间菌落数相差 ≤ 15.0%; 第 6 组无菌生长时, 所选中和剂及其浓度适宜。本试验中用含 10 g/L 硫代硫酸钠和 0.5% 吐温-80 的 TPS 溶液可有效中和含量为 500 mg/L 有效氯溶液和 1000 mg/L 过氧乙酸的残余作用, 中和剂及中和产物对受试菌及培养基无影响, 结果为 3 次试验平均值 (表 1)。

表 1 过氧乙酸复方消毒剂的中和剂选择试验结果

组别	平均回收菌落数 (CFU/片)
消毒液 + 菌悬液	0
(消毒液 + 菌悬液) + 中和剂	90
菌悬液 + 中和剂	28 300 000
(消毒液 + 中和剂) + 菌悬液	28 500 000
TPS + 菌悬液	27 000 000
TPS + 中和剂	0

2.2 悬液定量杀菌实验效果 不同浓度过氧乙酸复方消毒剂在 25℃ 条件下, 对枯草杆菌芽孢进行杀灭试验。当有效氯与过氧乙酸的含量分别为 300 mg/L 与 100 mg/L、100 mg/L 与 500 mg/L 时, 作用 15 min, 对芽孢的杀灭对数值均为 4.00; 当含量分别为 300 mg/L 和 500 mg/L 作用 15 min, 杀灭对数值达 7.75; 当含量分别为 500 mg/L 和 1000 mg/L 作用 10 min, 杀灭对数值即达 7.74 (表 2)。

表 2 过氧乙酸复方消毒剂对枯草杆菌芽孢杀灭结果

实验分组	复方消毒剂有效含量 (mg/L)		不同作用时间的平均杀灭对数值			
	有效氯	过氧乙酸	2 min	5 min	10 min	15 min
A	500	1000	3.23	3.70	>7.74	>7.74
B	300	500	1.19	3.53	4.01	>7.75
C	100	500	1.02	3.01	4.00	4.00
D	300	100	0.76	2.92	3.40	4.00

2.3 载体定性杀菌实验效果 经 5 次实验结果证明,以 500 mg/L 有效氯与 1000 mg/L 过氧乙酸组合及 300 mg/L 有效氯与 500 mg/L 过氧乙酸组合,对载体上枯草杆菌芽孢分别作用 15、30、45 min,各次实验的肉汤管均无菌生长,阳性对照肉汤管 10 支全部有菌生长,阳性对照组平均回收菌落数 5.4×10^6

CFU/片,阴性对照无菌生长。

2.4 模拟现场杀菌实验结果 四种复方消毒剂对枯草杆菌芽孢分别作用 10 min,杀灭对数值均达 3.5 以上,以有效氯与过氧乙酸的含量分别为 500 mg/L 和 1000 mg/L 时作用 10 min,杀灭对数值达 4.20 ~ 6.40(表 3)。

表 3 过氧乙酸复方消毒剂杀灭枯草杆菌芽孢的模拟现场实验结果

实验分组	复方消毒剂有效含量(mg/L)		对照组菌落数 (CFU/样本)	实验组菌落数 (CFU/样本)	杀灭对数值
	有效氯	过氧乙酸			
A	500	1000	2 510 000	0 ~ 155	4.20 ~ 6.40
B	300	500	2 100 000	50 ~ 350	3.81 ~ 4.62
C	100	500	1 950 000	185 ~ 433	3.66 ~ 4.03
D	300	100	2 380 000	210 ~ 425	3.75 ~ 4.06

3 讨论

近年来,随着新发传染病的不断出现,部分旧的传染病重新肆虐,特别是一些不明原因的传染性疾病的出现,给疫源地现场消毒处置工作带来了不少的麻烦^[5-6]。高效消毒剂大多具有较强的腐蚀性,降低浓度来减轻腐蚀性又恐达不到消毒效果,因此本研究的目的就是要配制一种具有高效消毒效果的复方消毒剂,用于不明原因感染性疾病的疫源地消毒处置和被污染装备的表面消毒。

实验结果表明,在室温下,含二氯二甲基海因及过氧乙酸的复方消毒液,对悬液中的枯草杆菌黑色变种芽孢均有较好的杀灭效果。含有 500 mg/L 有效氯与 1000 mg/L 过氧乙酸的 A 组复方消毒剂悬液杀菌时 10 min 的杀灭对数值达 7.74,载体定性杀菌时 15 min 杀灭率达 100%,模拟现场实验时,作用 10 min 杀灭对数值达 4.20 ~ 6.40,达到了高效消毒效果。

由于过氧乙酸的稳定性普遍较差,二元制剂虽有良好的稳定性,但使用前需合成 24 ~ 48 h,不适合应急条件下使用,且合成后的浓度和稳定性也欠理想,难以实现用作较长时间的贮备^[7-8],因此下一步

研究中,要解决好该复方消毒剂储存过程中的稳定性和有机物对杀菌效果影响的问题^[9]。

【参考文献】

- [1] 姚楚水,王长德,杨燕,等. 过氧乙酸杀灭微生物效果的试验观察[J]. 中国消毒学杂志,2003,20(4):254-255.
- [2] 钱万红,王忠灿,吴光华. 消毒杀虫灭鼠技术[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:107-113.
- [3] 沈建忠,赵国良,李茂全,等. 过氧乙酸复方消毒剂杀菌效果及腐蚀性试验观察[J]. 中国消毒学杂志,2001,18(1):11-14.
- [4] 邱洪流,谢琴,谢帆. 两种碘伏消毒液杀菌效果比较研究[J]. 中国消毒学杂志,2006,23(6):555-556.
- [5] 汪茂荣. 恙虫病的流行病学与诊治进展[J]. 东南国防医药,2009,11(6):526-529.
- [6] 刘士军. 做好大型军事演习部队卫生防疫保障的几点体会[J]. 东南国防医药,2009,11(3):285-286.
- [7] 张志成,张晓玲,蒋丽娟,等. 二元包装过氧乙酸杀菌效果和储存稳定性试验观察[J]. 中国消毒学杂志,2007,24(2):142-143.
- [8] 谭伟龙,钱万红,沈建忠. 过氧乙酸杀菌剂研究进展[J]. 医学动物防制,2008,9(9):641-643.
- [9] 曾宏远,谭伟龙. 某部队医院消毒灭菌效果的动态监测与分析[J]. 东南国防医药,2009,11(4):172-175.

(收稿日期:2009-12-08;修回日期:2010-02-12)

(本文编辑:潘雪飞;英文编辑:王建东)