

· 实验研究 ·

超声波清洗杀灭微生物效果的实验研究*

黄萍¹ 屈玲² 顾娟玲¹ 安银东¹ 杨聚才¹

(1 第四军医大学口腔医院检验科 陕西 西安 710032 2 第四军医大学西京医院检验科 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 观察超声波清洗在相等条件及不同的时间对微生物杀灭作用的影响。方法: 采用悬液法在相同时间内分别对大肠埃希菌、白色假丝酵母菌及 HBsAg 阳性血清进行了杀灭效果测试。结果: 超声波清洗 1min-15min 对大肠埃希菌杀灭率分别为 18.2%-94.2%, 对白色假丝酵母菌为 1.4%-49.7%。而超声波清洗 1min-15min 对 HBsAg 阳性血清的抗原性无完全破坏性作用。结论: 单一超声波清洗杀灭微生物的效果是随时间的延长杀灭微生物的效果越好。扫描电镜显示, 随着超声时间的延长, 细菌的细胞壁破坏越严重。而对 HBsAg 阳性抗原在短时间内不能被完全破坏。

关键词 超声波; 大肠埃希菌; 白色假丝酵母菌; 乙肝表面抗原; 扫描电镜

中图分类号: R445.1 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)19-3645-03

Experimental Study on Germicidal Efficacy of Ultrasound*

HUANG Ping¹, QU Ling², GU Juan-ling¹, AN Yin-dong¹, YANG Ju-cai¹

(1 Dept. of Clinical Laboratory, School of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Dept. of clinical laboratory, XiJing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: Ultrasound is an efficiency auxiliary sterilization method, which has been used for sterilization on surgery. To observe the effect of ultrasound cleaning at different time of killing microorganisms. **Methods:** Efficacy of the suspension method at the same time in killing *E. coli*, *Candida albicans* and HBsAg positive serum separately were tested. **Results:** The killing rate by ultrasonic cleaning from 1 min-15 min of the *Escherichia coli* is 18.2%-94.2%; that of the *Candida albicans* is 1.4%-49.7%. But for the HBsAg, there were no tangible effects. **Conclusion:** The single ultrasonic pasteurization effect of killing microorganisms get better with the lengthening of time. Scanning electron microscopy showed that the bacterial cell wall was more serious damaged by the ultrasonic was extended. The HBsAg positive serum can not be destroyed in a short time.

Key words: Ultrasound; *Escherichia coli*; *Candida albicans*; HBsAg; Scanning electron microscopy

Chinese Library Classification(CLC): R445.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)19-3645-03

超声波灭菌目前作为一种有效的辅助杀菌方法, 已经成功用于废水处理、饮用水消毒等领域^[1-3]。多数研究者都是用超声波和化学消毒剂联合应用, 从而提高杀灭微生物的效果^[4,5]。而使用超声波消毒杀灭微生物机制的研究报道较少。我们选用两种菌细胞体积差异比较大的细菌, 大肠埃希菌、白色假丝酵母菌菌种及 HBsAg 阳性血清进行了 1 min-15 min 的超声波杀灭实验并观察其影响, 并进行扫描电镜观察, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 悬液的制备

将大肠埃希菌(ATCC25922)转种 37℃培养 24 小时。白色假丝酵母菌(ATCC90028)转种于葡萄糖琼脂培养基, 37℃培养 48 小时。两种细菌分别用 PBS 洗涤、稀释, 配制所需浓度的细菌悬液备用, 从中每种细菌取三份涂平板, 放 37℃培养。菌落计数取均值。做阳性对照。HBsAg 阳性血清用生理盐水稀释配成实验悬液。

1.2 超声波清洗机

采用德国 VITA 公司超声波振荡机

1.3 大肠埃希菌和白色假丝酵母菌的杀灭实验

将已准备好的细菌悬液加入直径 14 mm 玻璃试管内, 放入超声波清洗机水槽内, 加水至浸没菌悬液面为止。开机计时, 从 1 min-15 min, 每隔 2 min 各取出三份菌悬液涂平板, 放 37℃培养 48 小时, 菌落计数, 取均值。

1.4 HBsAg 阳性抗原破坏实验

把 HBsAg 阳性 (1:10) 悬液加入至直径 14 mm 玻璃试管内, 加水至浸没菌悬液面为止。开机计时, 从 1 min-15 min, 每隔 3 min 各取出三份, 待检。

检测采用厦门新创公司生产的 ELISA 试剂盒, 同时设阳性对照组。实验重复三次。结果以 S/N 值 ≤ 2.1 为阴性, 表示抗原被完全破坏。

2 结果

* 基金项目 陕西省科学技术研究发展计划项目(2010K16-01-09)

作者简介 黄萍 (1975-) 女, 博士研究生, 主管检验师, 主要研究方向 临床检验医学,

电话: 029-84776185, E-mail: huangping@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2012-02-19 接受日期: 2012-03-22)

2.1 单一超声波悬液法杀灭微生物和 HBsAg 阳性的实验结论

结果表明,单一使用超声波消毒 1min 的时候,对大肠埃希菌的杀灭率仅为 18.2%,而超声波消毒 15min 时,对大肠埃希

菌的杀灭率为 94.2%。超声波消毒 1min、15min 时,对白色假丝酵母菌的杀灭率分别为 1.4% 和 49.7%。超声波消毒 1min-15min 对 HBsAg 阳性抗原均无破坏作用(图 1)。

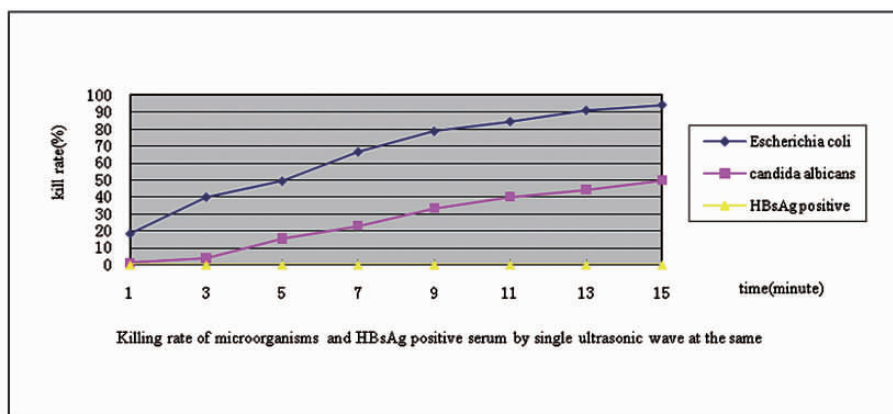


图 1 单一超声波在相同时间内对微生物和 HBsAg 阳性的杀灭率

Fig.1 Killing rate of microorganisms and HBsAg positive serum by single ultrasonic wave at the same time

2.2 超声前后大肠埃希菌、白色假丝酵母菌的扫描电镜分析

2.2.1 图 2-1 显示超声前大肠埃希菌菌细胞形态,大小为

(1.1-1.5) μm $\times$ (2.0-6.0) μm ,菌细胞完整;图 2-2 显示超声 15 min 后,绝大部分大肠埃希菌菌细胞破碎。

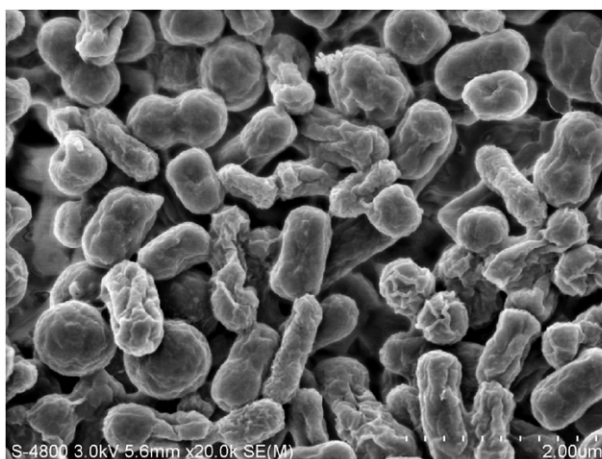


图 2-1 超声前大肠杆菌(扫描电镜 $\times 20000$)

Fig. 2-1 The SEM of Escherichia coli before Ultrasound

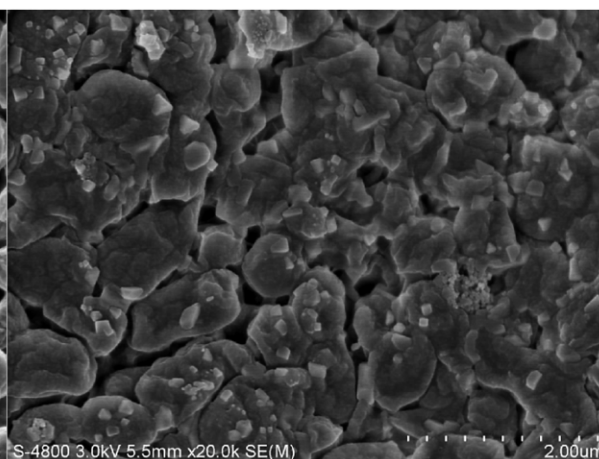


图 2-2 超声后大肠杆菌(扫描电镜 $\times 20000$)

Fig.2-2 The SEM of Escherichia coli after Ultrasound

2.2.2 图 2-3 显示超声前的白色假丝酵母菌细胞形态,大小为 (1.1-1.5) μm $\times$ (2.0-6.0) μm ,菌细胞完整;图 2-4 显示超声 15 min 后,绝大部分白色假丝酵母菌菌细胞发生破碎。

3 讨论

超声波消毒机具有体积小,携带轻便,使用方便,快速杀灭微生物等优点,但影响其杀灭效果的因素也比较多^[6]。超声波被使用于蔬菜表面的细菌杀灭,与水、氯、次氯酸钠、过氧乙酸等消毒剂相比,灭菌效果显著^[7]。超声波也可应用于生物膜表面细菌的消毒灭菌^[8-9]在医疗上,超声波消毒的领域为小器械、贵重医疗器械、不易清洗消毒的医疗器械的清洗^[10,11]。

超声波杀灭微生物是一种复杂的生物理论。有研究使用透射电镜观察到超声波作用于大肠杆菌和变形链球菌时,菌体内

部会产生空化气泡^[12]。目前学者多认为,超声波在液体介质中传播时会产生超声空化现象,它可以激发一系列的物理化学变化过程,产生许多复杂的非线性声学效应。这些效应中的高温效应、压力效应和放电效应能够深入渗透到细菌的内部组织,从而破坏细菌的组织结构,达到杀灭细菌的目的^[13]。超声波杀灭微生物受外界影响因素较多,在一定频率范围内,超声波频率高,能量大,则杀菌效果好,反之,则差。但频率太大,则不易产生空化作用,杀菌率反而降低。菌液浓度低,超声频率高,超声时间长,菌细胞破坏的越多。振荡时间的长短,菌悬液浓度的高低,也是影响超声波杀菌效果的主要因素^[14]。菌液容量越多,其超声波杀灭微生物的效率越低。这是由于超声波透入媒介的过程中不断的将能量传给媒介,而自身随着传播距离的延长而逐渐减弱,所以容量大,微生物破坏的百分率随之降低。单纯的



图 2-3 超声前白色假丝酵母菌(扫描电镜× 20000)

Fig. 2-3 The SEM of candida albicans before Ultrasound

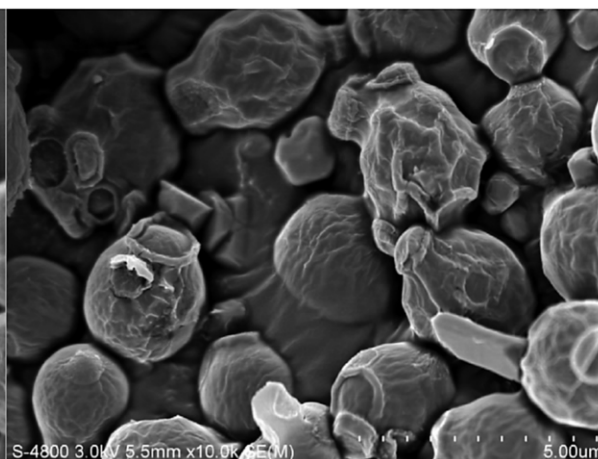


图 2-4 超声后白色假丝酵母菌(扫描电镜× 20000)

Fig.2-4 The SEM of candida albicans after Ultrasound

超声波清洗消毒随着时间的延长,其微生物的杀灭率也会增加,15 min 时灭菌效果达到最佳,表明超声时间对灭菌效果有很大的影响,与文献报道一致^[15-16]。超声波对 HBsAg 无破坏作用,表明超声波对乙型肝炎 HBsAg 无杀灭效果。联合化学制剂、pH 值调整、加热等因素时超声波灭菌效果,结果报道不一致^[17-19]。在本研究中,扫描电镜证实超声波对杀灭微生物有效,而其杀灭微生物的途径是直接作用到菌细胞使菌细胞破碎而死亡。研究提示,单纯超声波作为医疗器械的消毒灭菌仪器,其灭菌效率尚可。而加热、酸等化学制剂与超声波联合消毒作用也有待于进一步研究,以提高单一因素的灭菌效率。

参考文献(References)

- [1] Cui X, Talley JW, Liu G, Larson SL. Effects of primary sludge particulate (PSP) entrapment on ultrasonic (20kHz) disinfection of *Escherichia coli*[J]. *Water Res*, 2011,45(11): 3300-3308
- [2] Talan DA, Partida CN. Emergency department ultrasound infection control: do unto (and into) others [J]. *Ann Emerg Med*, 2011,58(1): 64-66
- [3] Scherba G, Weigel RM, O'Brien WD Jr. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991,57(7):2079-2084
- [4] 李二卫. 超声波清洗、戊二醛消毒后内窥镜微生物学检测与评价[J]. *河南预防医学杂志*, 2010,21(6):417-418
Li Er-wei. Ultrasonic cleaning endoscopes after disinfection glutaraldehyde microbiological testing and evaluation [J]. *Henan Journal of prevention medicine*, 2010,21(6):417-418(In Chinese)
- [5] Jatzwauk L, Schöne H, Pietsch H. How to improve instrument disinfection by ultrasound[J]. *J Hosp Infect*, 2001,48 Suppl A:80-83
- [6] Fredericks IN, du Toit M, Krü gel M. Efficacy of ultraviolet radiation as an alternative technology to inactivate microorganisms in grape juices and wines[J]. *Food Microbiol*, 2011, 28(3):510-517
- [7] Zhou B, Feng H, Luo Y. Ultrasound enhanced sanitizer efficacy in reduction of *Escherichia coli* O157:H7 population on spinach leaves [J]. *J Food Sci*. 2009,74(6):M308-313
- [8] Bigelow TA, Northagen T, Hill TM. The destruction of *Escherichia coli* biofilms using high-intensity focused ultrasound [J]. *Ultrasound Med Biol*, 2009,35(6):1026-1031
- [9] Bigelow TA, Northagen T, Hill TM. Ultrasound histotripsy and the destruction of *Escherichia coli* biofilms[J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2008,2008:4467-4470
- [10] Frazee BW, Fahimi J, Lambert L, et al. Emergency department ultrasonographic probe contamination and experimental model of probe disinfection[J]. *Ann Emerg Med*, 2011,58(1):56-63
- [11] Ayyildiz O, Sanik S, Ileri B. Effect of ultrasonic pretreatment on chlorine dioxide disinfection efficiency [J]. *Ultrason Sonochem*, 2011,18(2):683-688
- [12] Koda S, Miyamoto M, Toma M, Matsuoka T. Inactivation of *Escherichia coli* and *Streptococcus mutans* by ultrasound at 500kHz [J]. *Ultrason Sonochem*, 2009,16(5):655-659
- [13] 卢群, 丘泰球. 超声波辐照对大肠杆菌细胞膜的影响[J]. *华南理工大学学报: 自然科学版*, 2006,34(12):51-54
Lu Qun, Qiu Tai-qiu. Preparation of MFI-Type Zeolite Membrane for Pervaporation Separation of Xylene Isomers[J]. *Journal of south china university of technology*, 2006,34(12):51-54 (In Chinese)
- [14] 张红雨, 李迎新, 张弥左. 超声波对高电位氧化还原水灭菌效果影响的实验研究[J]. *微生物学杂志*, 2006,26(6):30-31
Zhang Hong-yu, Li Ying-xin, Zhang Mi-zuo. Germicidal Effect of Electrolyzed Oxidizing Water with Ultrasound [J]. *Journal of microbiology*, 2006,26(6):30-31(In Chinese)
- [15] Allison DG, D'Emanuele A, Eginton P, Williams AR. The effect of ultrasound on *Escherichia coli* viability[J]. *J Basic Microbiol*, 1996,36(1):3-11
- [16] Hedges M, Lewis M, Lunec J, Cramp WA. The effect of ultrasound at 1.5 MHz on *Escherichia coli* [J]. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1980,37(1):103-108
- [17] Salleh-Mack SZ, Roberts JS. Ultrasound pasteurization: the effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922 [J]. *Ultrason Sonochem*, 2007,14(3): 323-329
- [18] Scouten AJ, Beuchat LR. Combined effects of chemical, heat and ultrasound treatments to kill *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds[J]. *J Appl Microbiol*, 2002,92(4):668-674
- [19] Sagong HG, Lee SY, Chang PS. Combined effect of ultrasound and organic acids to reduce *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on organic fresh lettuce[J]. *Int J Food Microbiol*, 2011,145(1):287-292