

细菌生物被膜与游离菌对消毒剂抗性比较研究

张丽蓉 宋金武 黎英文 邓金花* 广东环凯微生物科技有限公司 (广东广州 510663)

文章编号: 1006-6586(2018)23-0025-04 中图分类号: R197.39 文献标识码: A

内容提要: 目的: 比较形成生物被膜的细菌和游离菌对消毒剂的抗性。方法: 采用超声波平板法和载体浸泡定量杀菌试验进行实验室观察。结果: 用含800mg/L的过氧乙酸消毒剂作用1min, 对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌的平均杀灭率分别为90.53%、87.64%和83.16%, 对其细菌生物被膜的平均杀灭率仅为82.56%、84.81%和82.85%; 用含150mg/L的二氧化氯消毒剂作用1min, 对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌的平均杀灭率分别为96.95%、96.18%和96.05%, 对其细菌生物被膜的平均杀灭率仅为86.37%、89.54%和91.20%。结论: 形成生物被膜的细菌对消毒剂抗性都比游离菌强, 鲍曼不动杆菌差异尤为明显。

关键词: 生物被膜 游离菌 抗性 超声波平板法 载体浸泡定量杀菌

Comparative Study on Bacterial Biofilm and Bacteria Resistance to Disinfectant

ZHANG Li-rong SONG Jin-wu LI Ying-wen DENG Jin-hua* Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech. Co., Ltd. (Guangdong Guangzhou 510663)

DOI:10.15971/j.cnki.cmdi.2018.23.011

生物被膜是指细菌黏附于接触表面, 分泌多糖基质、纤维蛋白、脂质蛋白等, 将其自身包绕其中而形成的大量细菌聚集膜样物, 具有普遍存在, 难发现和难去除等特点。虽然生物被膜是细菌等微生物存在的主要形式, 具有重要的研究意义, 但多年来经典细菌学主要研究的是浮游生长的细菌, 而忽视了对细菌生物被膜的研究^[2]。目前国内对生物被膜的研究主要集中在医学领域, 对其他相关领域中的生物被膜研究报道较少, 研究理论基础相对薄弱^[1]。为比较研究医学领域、食品工业中常见的细菌生物被膜和游离菌对消毒剂抗性的大小, 选择环凯牌二氧化氯消毒液和HKM过氧乙酸消毒液作为实验消毒剂, 通过超声波平板法和载体浸泡定量杀菌试验比较其杀菌效果。现将结果报告如下。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

实验用消毒剂: 环凯牌二氧化氯消毒液、HKM过氧乙

酸消毒液由广东环凯微生物科技有限公司研制。实验时, 用无菌标准硬水配制成不同浓度溶液, 现配现用。

试验菌为鲍曼不动杆菌(ATCC 19606)、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853), 由广东省微生物菌种保藏中心提供。

1.2 方法

1.2.1 细菌生物被膜的培养

用丙酮浸泡不锈钢片除去表面的油脂, 然后把不锈钢片置于5mol/L盐酸溶液中浸泡15min, 用洗涤剂清洗, 再用蒸馏水冲洗干净, 将处理后的不锈钢片放入含有5mL TSB培养液的试管中, 121°C灭菌15min, 待用。分别将鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌接种在TSB培养液中37°C培养过夜, 18h后使其活菌数达108CFU/mL。在含TSB溶液和不锈钢片的无菌试管中, 加入0.1mL上述菌悬液, 每隔24h更换1次TSB培养液, 于37°C连续培养7d, 即可形成稳定生物被膜。

收稿日期: 2018-09-03

作者简介: 邓金花, 通讯作者。

1.2.2 游离菌悬液

分别将鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌分离培养，取典型菌落接种营养琼脂培养基斜面，培养24h，将新鲜斜面培养物用胰蛋白胨生理盐水洗下并稀释成含菌量为 $1.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^8$ CFU/mL 试验菌悬液。

1.2.3 中和剂鉴定试验

试验菌为鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌，试验设6组，按照2002版《消毒技术规范》中规定的中和剂鉴定试验程序进行试验。结果，以第1组无菌生长或菌数远少于第2组；第2组菌数超过5CFU/mL；第3、4、5组菌数为 $1.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^8$ CFU/mL，且组间菌落数误差小于15%；第6组不长菌，表明所选中和剂及其浓度适宜。试验重复2次^[3]。

1.2.4 载体浸泡定量杀菌实验

按照2002版《消毒技术规范》中规定的载体浸泡定量杀菌试验程序进行试验。

1.2.5 超声波平板法杀菌试验

将培养7d的不锈钢片从TSB培养液中取出，经无菌PBS清洗后分别放入已稀释至相应浓度的消毒液试管中，待菌药相互作用至各预定时间，用无菌镊子将菌片分别移入装有5.0mL中和剂的试管中，将上述试管置于超声波清洗器中，设定超声处理温度为25℃，超声波功率为95W进行超声震荡10min。将超声波处理后的样液在无菌条件下，取样（或作适当稀释后，取相应稀释度的稀释液）1mL，置于灭菌平皿内，每管接种两个平皿，倾注营养琼脂培养基，混匀，37℃培养24~48h后进行活菌菌落计数，计算平均杀灭率。试验重复3次。

阳性对照组：将培养7d的不锈钢片从TSB培养液中取出，经无菌PBS清洗放入装有5mL PBS的试管中作用至相应时间，将上述试管置于超声波清洗器中，设定超声处理温度为25℃，超声波功率为95W进行超声震荡10min。将超声波处理后的样液在无菌条件下，取样（或作适当稀释后，取相

应稀释度的稀释液）1mL，置于灭菌平皿内，每管接种两个平皿，倾注营养琼脂培养基，混匀，37℃培养24~48h后进行活菌菌落计数，计算平均杀灭率。试验重复3次。

2. 结果

2.1 中和剂鉴定试验结果

结果表明，用含5g/L 硫代硫酸钠+3g/L 卵磷脂+10g/L 吐温80组成的磷酸盐缓冲液（PBS）作为中和剂，可有效中和环凯牌二氧化氯消毒液和HKM过氧乙酸消毒液最高试验浓度溶液对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的残余作用，且中和剂和中和产物对试验菌及培养基均无影响。见表1。

2.2 杀菌试验结果

2.2.1 过氧乙酸消毒剂杀菌实验结果

用含800mg/L的过氧乙酸消毒剂作用1min，对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌的平均杀灭率分别为90.53%、87.64%和83.16%，对其细菌生物被膜的平均杀灭率分别为82.56%、84.81%和82.85%；含1500mg/L的过氧乙酸消毒剂作用1min，对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌的平均杀灭率分别为94.55%、92.36%和90.34%，对其细菌生物被膜的平均杀灭率分别为88.11%、89.17%和89.17%；含2000mg/L的过氧乙酸消毒剂作用1min，对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌的平均杀灭率分别为98.10%、97.05%和96.18%，对其细菌生物被膜的平均杀灭率分别为93.55%、94.73%和93.18%。见表2。

2.2.2 二氧化氯消毒剂杀菌实验结果

含150mg/L的二氧化氯消毒剂作用1min，对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌的平均杀灭率分别为96.95%、96.18%和96.05%，对其细菌生物被膜的平均杀灭率分别为86.37%、89.54%和91.20%；含250mg/L的二

表 1. 中和剂鉴定试验结果

组别	各组平均回收菌数(CFU/mL)		
	鲍曼不动杆菌	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌
1	0	0	0
2	11	10	21
3	312 000 000	158 000 000	352 000 000
4	310 000 000	155 000 000	343 000 000
5	308 000 000	159 000 000	368 000 000
6	0	0	0

表2. 过氧化氢消毒剂杀菌效果

试验菌	过氧化氢消毒剂浓度 (mg/L)	作用不同时间平均杀灭率 (%)						阳性对照组平均菌落数 (CFU/mL)
		1min		5min		10min		
		生物被膜	游离菌	生物被膜	游离菌	生物被膜	游离菌	
鲍曼不动杆菌	800	82.56	90.53	86.35	98.89	91.16	100	1.35 × 10 ⁶
	1500	88.11	94.55	99.98	100	100	100	
	2000	93.55	98.10	100	100	100	100	
金黄色葡萄球菌	800	84.81	87.64	89.56	98.63	93.27	100	4.10 × 10 ⁶
	1500	89.17	92.36	100	100	100	100	
	2000	94.73	97.05	100	100	100	100	
铜绿假单胞菌	800	82.85	83.16	87.53	93.53	91.80	99.45	2.55 × 10 ⁶
	1500	89.17	90.34	100	100	100	100	
	2000	93.18	96.18	100	100	100	100	

表3. 二氧化氯消毒剂杀菌效果

试验菌	二氧化氯消毒剂浓度 (mg/L)	作用不同时间平均杀灭率 (%)						阳性对照组平均菌落数 (CFU/mL)
		1min		5min		10min		
		生物被膜	游离菌	生物被膜	游离菌	生物被膜	游离菌	
鲍曼不动杆菌	150	86.37	96.95	96.18	99.98	98.24	100	3.18 × 10 ⁶
	250	90.58	98.03	98.57	100	99.60	100	
	400	96.31	100	99.51	100	100	100	
金黄色葡萄球菌	150	89.54	96.18	98.12	99.24	99.92	100	2.45 × 10 ⁶
	250	92.17	97.35	99.08	100	99.99	100	
	400	98.56	100	99.96	100	100	100	
铜绿假单胞菌	150	91.20	96.05	99.10	99.54	99.92	100	4.39 × 10 ⁶
	250	95.22	99.10	99.84	100	100	100	
	400	99.45	100	99.98	100	100	100	

氧化氯消毒剂作用 1min, 对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌的平均杀灭率分别为98.03%、97.35%和99.10%, 对其细菌生物被膜的平均杀灭率分别为 90.58%、92.17%和 95.22%; 含 400mg/L 的二氧化氯消毒剂作用 1min, 对鲍曼不动杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌游离菌的平均杀灭率均为 100%, 而对其细菌生物被膜的平均杀灭率仅为 96.31%、98.56%和 99.45%。见表 3。

3. 讨论

实验结果表明, 形成生物被膜的细菌对过氧化氢和二氧化氯两种消毒剂抗性都比游离菌强, 其中鲍曼不动杆菌差异尤为明显, 这与国内相关研究结果吻合, 国内多项研究均表示鲍曼不动杆菌的多重耐药性与生物被膜的形成有密切关系^[4]。

从理论上讲, 生物被膜是细菌在接触表面生活时采取的生长方式, 这是细菌的一种本能, 任何细菌均有可能形成生

物被膜。形成生物被膜的细菌对消毒剂有很强的抵抗力, 也就是医学上常说的“耐药性”。生物被膜是细菌在接触表面形成的高度组织化的多细胞结构, 其中的 EPS (胞外聚合物) 起屏障作用, 限制抗生素分子向细菌细胞运输, 多糖蛋白复合物还可与一些药物反应, 具有中和药物的活性^[5]。近年来有研究表明生物被膜中存在许多毛细管状的水通道, 是一种多孔渗水结构, 这种结构有利于水和营养物质的分散, 能将营养物质从生物被膜的表面输送给底部的微生物, 同时微生物的代谢产物也能从底部传送到表面, 排出体外。所以生物被膜中微生物其形态结构、生理、生化特性及消毒剂的敏感性都与浮游生长的微生物显著不同, 形成生物被膜的细菌不仅可以抵制消毒剂的作用, 也可以对抗外在压力, 如缺水、营养成分缺乏等情况^[6]。近年来, 细菌感染日趋严重, 而生物被膜作为细菌耐药的主要因素, 如何防止生物被膜的形成、及时清除已形成的生物被膜, 深入研究生物被膜耐药机制及相关调控基因表达, 也许将成为未来研究细菌耐药机制的热点。

参考文献

- [1] 金树,赵建红. 细菌生物膜的形成及影响因素[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(18):2519-2520.
- [2] 王龙祥. 铜绿假单胞菌生物被膜抑制药研究进展[J]. 中国感染控制杂志,2011,10(1):74.
- [3] 卫生部卫生法制与监督司. 消毒技术规范[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部,2002.
- [4] 徐燕,吴晓松,谈智,等. 鲍曼不动杆菌抗药基因检测及对消毒剂抗性研究[J]. 中国消毒学杂志,2008,25(4):341-343.
- [5] Song JY, Cheong HJ, Noh JY, et al. In vitro Comparison of Anti-Biofilm Effects against Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii: Imipenem, Colistin, Tigecycline, Rifampicin and Combinations[J]. Infect Chemother,2015,47(1):27-32.
- [6] Badave GK, Kulkarni D. Biofilm Producing Multidrug Resistant Acinetobacter baumannii: An Emerging Challenge[J]. J Clin Diagn Res,2015,9(1):DC08-10.

(上接第22页)

测试方法:在T-组合婴儿复苏系统内部软管和附件组成的管路上分别取5个压力采样点,分别是靠近安全阀出口处的A采样点,靠近复苏流量接头入口的B采样点,靠近复苏流量接头出口的C采样点,PEEP阀进气端的D采样点,PEEP阀患者端的E采样点。VT Plus HF在压力采样点E测量压力。将压力检测器的采样软管更换不同采样角度分别接入A、B、C、D四个采样点,读取记录压力检测器和VT Plus HF测量显示的数值。

测试步骤:①T-组合婴儿复苏系统接上压缩气源,连接附件,将VT Plus HF接入采样点E;②将压力检测器用采样软管与主气流软管成夹角的方式接入采样点A;③将PIP设置成30cmH₂O,封堵PEEP阀的开口,观察VT Plus HF和压力检测器中的数值并记录下来;④调节PEEP阀螺帽,将VT Plus HF中的数值分别调至20cmH₂O、15cmH₂O、10cmH₂O、5cmH₂O的接近值,同时记录下压力检测器中的数值;⑤将压力检测器采样管改成垂直于主气流软管接入方式,重复进行②③④操作;⑥更换采样点进行采样,重复②③④⑤操作。

在进行PIP数值测试时,不管压力检测器在哪个取样点测得的实际压力值都与VT Plus HF测得的压力值相等。由于压力检测器存在读数误差,压力检测器数值读数与VT Plus HF测得的压力值存在偏差。由上表数据可得压力检测器读数偏差范围为0.009~0.014。所以,在测试PEEP时,如果得到的读数偏差≤0.014,即可视为压力检测器读数与实际压力值一致。

从表格中测得的A采样点数据得知,压力检测器采样软管与主气流管道成夹角的采样方式测得的压力范围偏差为0.148~1.594;垂直采样方式的偏差范围为0.105~1.213。在A

点垂直采样方式比夹角采样偏差范围要小。但两种方式的偏差都>0.014,压力检测器显示的压力读数都不合格。

从表格中测得的B采样点数据得知,压力检测器采样软管与主气流管道成夹角的采样方式测得的压力范围偏差为0.098~1.007;垂直采样方式的偏差范围为0.006~0.013。在B点垂直采样方式比夹角采样偏差范围要小。夹角采样方式的偏差>0.014为不合格,垂直采样方式的偏差范围<0.014,压力检测器显示的压力读数合格。

从表格中测得的C、D采样点数据得知,压力检测器中测得的压力值偏差范围分别为0.001~0.014、0.001~0.013,都<0.014,在这两个点压力检测器显示的压力读数都是合格的。

综合比较A、B两个采样点,可得知在相同位置时,垂直采样方式的偏差范围比夹角采样方式要小。用相同采样方式对比下,B点压力检测器读数偏差比A点小。从而可以看出采样方式和位置都是影响压力检测器读数的重要因素。

3. 结论

从2.3实验测试数据中得出的数据对比结果,证明气体流动方程和计算流体分析的推论为正确,而压力检测器不同的采样方式和位置均会影响PEEP值的准确性。

为了节约复苏抢救时间,以及提高操作的方便性,T-组合婴儿复苏系统(BQ70)在内部进行压力采样。为了使压力检测器显示的压力值更接近患者端的PEEP,T-组合婴儿复苏系统(BQ70)在B采样点用垂直主气流管道的方式进行压力采样,压力检测器中的压力读数偏差范围为0.006~0.013,小于压力检测器允许的读数偏差为0.014,完全满足要求。

参考文献

- [1] 何存兴,张铁华. 液压传动与气压传动[M].2版.武汉:华中科技大学出版社,2000.
- [2] 刘建军,刘源全. 流体力学[M].北京:北京大学出版社,2006.
- [3] 中国新生儿复苏项目专家组. 中国新生儿复苏指南(2016年北京修订)[J]. 中华围产医学杂志,2016,19(7):481-586.