

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.13.037

# 消毒剂对不同材料表面大肠埃希菌生物膜的灭菌效果

王亚洲, 詹峰

(苏州大学附属常州肿瘤医院, 江苏常州 213000)

**摘要:**目的 研究大肠埃希菌在不同材料表面形成生物膜的能力及消毒剂对生物膜细菌的灭菌功效。方法 结晶紫染色法大肠埃希菌比较不同材料表面形成的生物膜能力,检测 75%乙醇、有效氯 500 mg/L 消毒液、5%碘伏、0.2%过氧乙酸、2%新洁尔灭对生物膜的灭菌功效。结果 大肠埃希菌在塑料、玻璃及不锈钢表面均可形成生物膜,在不锈钢表面形成生物膜的能力强于塑料表面和玻璃。除碘伏(5%)外,乙醇(75%)、有效氯(500 mg/L)、碘伏(5%)、过氧乙酸(0.2%)、新洁尔灭(2%)均可在 1 min 杀灭生物膜细菌,5%碘伏 5 min 方可杀灭生物膜内细菌。结论 大肠埃希菌在不同材料表面均能形成生物膜,消毒剂均能杀灭生物膜细菌。

**关键词:**大肠埃希菌; 物体表面; 生物膜; 消毒剂

**中图分类号:**R187;R378.2+1

**文献标志码:**A

**文章编号:**1672-9455(2018)13-1985-02

近年来,大肠埃希菌的分离率在住院患者感染的病原体中一直占首位,其中 50%以上的大肠埃希菌产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs),产 ESBLs 的大肠埃希菌株使得大肠埃希菌对药物的耐药率明显提高<sup>[1-5]</sup>。在自然环境中,约 80%微生物以生物膜状态存在<sup>[6]</sup>。生物膜是微生物黏附于物体表面或组织,包含在自身分泌的保护性细胞外基质内的高度结构化的微生物群体,生物膜的结构可保护膜内的细菌抵抗各种环境压力,使细菌长期存活<sup>[7]</sup>。在医院内感染的发生过程中,65%与生物膜有关<sup>[8]</sup>。

本实验研究了大肠埃希菌 ATCC25922 在塑料、玻璃及不锈钢表面形成生物膜的能力,并比较了 ATCC25922 与本院分离于无菌体液的 9 株产 ESBLs 大肠埃希菌生物膜形成能力的差别,也对医院常用消毒剂对大肠埃希菌 ATCC25922 生物膜的灭菌功效进行了研究。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 标准菌株大肠埃希菌 ATCC25922 购自原卫生部临床检验中心,9 株产 ESBLs 大肠埃希菌分离自 2015 年 10 月至 2016 年 2 月无菌体液标本,编号分别为 25、26、30、38、45、54、58、59、68, -70℃ 保存于 15%甘油肉汤。

**1.2 试剂与仪器** 结晶紫染液(贝索公司),消毒剂中和剂(温州康泰),过氧乙酸(上海哈勃),戊二醛(江西汇康),次氯酸钠(江苏爱物福),乙醇(江西汇康),碘伏(江西汇康)。BEPⅢ酶标仪(德国西门子),96 孔培养板(浙江拱东)。购买厚度为 0.5 mm 的塑料片、普通不锈钢片及玻璃片,用剪刀和玻璃刀切割制成 4.0 mm×20.0 mm×0.5 mm 的塑料片、玻璃片及普通不锈钢片,实验前经 75%乙醇浸泡 10 min。

## 1.3 方法

**1.3.1 生物膜形成检测** 根据文献[9-10]所述方法,

将分离的实验菌调为 0.5 麦氏单位的菌液,然后用胰蛋白胨大豆肉汤培养液稀释为  $10^6$  CFU/mL。实验根据材料分为塑料组、玻璃组和不锈钢组。将塑料片、玻璃片及不锈钢片置于试管内,分别吸 2 mL 上述菌液于试管内,35℃培养 24 h,将塑料片、玻璃片及不锈钢片分别移至无菌试管内,生理盐水洗去游离的细菌,甲醇固定 15 min,待干后加结晶紫染液染色 10 min,洗去未结合的染液,待干后加入 95%乙醇 2 mL 脱色 10 min,吸 100  $\mu$ L 到 96 孔板内,酶标仪 570 nm 测吸光度(A)值,比较各组吸光度的变化。不加菌液孔作为阴性对照,测定孔吸光度大于阴性对照孔吸光度为生物膜阳性<sup>[11]</sup>。

**1.3.2 消毒剂对生物膜的灭菌效果** 依上述方法将形成生物膜的塑料片、玻璃片及不锈钢片分别转移至无菌试管内,分别加入 75%乙醇、有效氯 500 mg/L 消毒液、5%碘伏、0.2%过氧乙酸、2%新洁尔灭各 2 mL,以不加消毒液管为对照管,各作用 1、5、15、30、60 min 后吸去消毒液,加入含有相应中和剂的营养肉汤 2 mL,35℃培养 12 h,转种到营养琼脂平板,35℃培养 24 h 观察有无细菌生长。

**1.4 统计学处理** 使用 SPSS19.0 软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析不同菌株的生物膜形成能力,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大肠埃希菌不同材料表面形成生物膜能力** ATCC25922 大肠埃希菌在塑料、玻璃及不锈钢的表面均可形成生物膜,在不锈钢表面形成生物膜的能力均强于塑料表面和玻璃表面( $P < 0.05$ ),见表 1。

**2.2 产 ESBLs 大肠埃希菌在不同材料表面形成生物膜能力** 本研究的 9 株产 ESBLs 大肠埃希菌在塑料、玻璃及不锈钢表面均可形成生物膜,与

ATCC25922 差异无统计学意义( $P>0.05$ );各菌株在不锈钢表面形成生物膜的能力均强于塑料表面和玻璃表面,见表 2。

表 1 ATCC25922 大肠埃希菌在不同材料表面生物膜的形成能力(A 值,  $\bar{x}\pm s$ )

| 菌株类型      | 塑料组         | 玻璃组          | 不锈钢组         |
|-----------|-------------|--------------|--------------|
| ATCC25922 | 0.083±0.004 | 0.205±0.076* | 2.867±0.329* |
| 阴性对照      | 0.063±0.005 | 0.107±0.003  | 1.450±0.050  |

注:与塑料组相比,\* $P<0.05$

表 2 产 ESBLs 大肠埃希菌在不同材料表面形成生物膜的能力(A 值,  $\bar{x}\pm s$ )

| 菌株        | 塑料组          | 玻璃组          | 不锈钢组        |
|-----------|--------------|--------------|-------------|
| 25        | 0.082±0.006* | 0.220±0.035* | 2.683±0.163 |
| 26        | 0.096±0.019* | 0.184±0.056* | 2.784±0.177 |
| 30        | 0.087±0.014* | 0.174±0.049* | 2.817±0.201 |
| 38        | 0.083±0.015* | 0.146±0.038* | 2.889±0.071 |
| 45        | 0.083±0.019* | 0.173±0.037* | 2.938±0.175 |
| 54        | 0.076±0.006* | 0.194±0.072* | 2.992±0.189 |
| 58        | 0.085±0.008* | 0.141±0.052* | 3.002±0.203 |
| 59        | 0.085±0.008* | 0.142±0.059* | 2.969±0.216 |
| 68        | 0.076±0.003* | 0.162±0.062* | 2.939±0.138 |
| ATCC25922 | 0.083±0.004* | 0.205±0.076* | 2.867±0.329 |

注:与不锈钢组相比,\* $P<0.05$

**2.3 不同消毒剂对生物膜细菌的灭菌功效** 使用乙醇(75%)、有效氯(500 mg/L)、碘伏(5%)、过氧乙酸(0.2%)、新洁尔灭(2%)对不同材料表面生物膜分别作用 1、5、15、30、60 min,发现乙醇(75%)、有效氯(500 mg/L)、过氧乙酸(0.2%)、新洁尔灭(2%)均可在 1 min 杀灭生物膜细菌;碘伏(5%)作用生物膜细菌 1 min,仍有细菌存活,需要 5 min 方可杀灭生物膜细菌。

### 3 讨论

塑料、玻璃及不锈钢材料普遍存在于医院各种环境表面,细菌在医院环境中的各种物体表面形成生物膜,是住院患者潜在的感染源之一。本实验发现大肠埃希菌株 ATCC25922 及从临床分离的 9 株产 ESBLs 大肠埃希菌株均可在塑料、玻璃及不锈钢材料表面形成生物膜,且 ATCC25922 与产 ESBLs 大肠埃希菌无明显差异。大肠埃希菌在不锈钢材料表面形成生物膜的能力最强,玻璃材料次之。CREMET 等<sup>[10]</sup>也发现金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌在不锈钢材料上比聚乙烯材料更易形成生物膜,此现象与不锈钢表面

光滑程度不如玻璃和塑料有关。尽管有研究报道生物膜内细菌的抵抗力比游离菌显著增高,但在本实验中,乙醇(75%)、有效氯(500 mg/L)、过氧乙酸(0.2%)、新洁尔灭(2%)可以在 1 min 杀灭生物膜内细菌,碘伏也可在 5 min 杀灭生物膜内细菌。因此,采用适宜的消毒剂和正确的消毒时间对环境表面消毒,便可降低感染的危险因素,预防、控制医院感染的发生。

### 参考文献

- [1] 朱德妹,汪复,胡付品. 2010 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2011,11(5):321-329.
- [2] 肖永红,沈萍,魏泽庆,等. Mohnarin 2011 年度全国细菌耐药监测[J]. 中华医院感染学杂志,2012,22(22):4947-4952.
- [3] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2012 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,13(5):321-330.
- [4] 胡付品,朱德妹,汪复,等. 2013 年中国 CHINET 细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2014,14(5):365-374.
- [5] 汪复,朱德妹,胡付品,等. 2014 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2015,15(5):401-410.
- [6] BALCAZAR J L, SUBIRATS J, BORREGO C M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance[J]. Front Microbiol,2015,6:1216-1220.
- [7] RABIN N, ZHENG Y, OPOKU-TEMENG C, et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents[J]. Future Med Chem, 2015, 7(4): 493-512.
- [8] WU H, MOSER C, WANG H Z, et al. Strategies for combating bacterial biofilm infections[J]. Int J Oral Sci, 2015, 7(1):1-7.
- [9] WANG Y, WU X, CHEN J, et al. Antimicrobial blue light inactivation of gram-negative pathogens in biofilms: in vitro and in vivo studies[J]. J Infect Dis, 2016, 213(9): 1380-1387.
- [10] CREMET L, CORVEC S, BATARD E, et al. Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of Escherichia coli [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75(3):252-255.
- [11] 解范迪,朱术孟,施锦杰,等. 产志贺毒素大肠埃希菌生物被膜形成能力与毒力基因表达的关系[J]. 检验医学, 2015,30(6):617-621.