

许琦,赵月,黄伟健,等. 高通量氙光传递窗与紫外传递窗灭菌效果观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 44-49.

Xu Q, Zhao Y, Huang WJ, et al. Comparison of sterilization effect between High-throughput Xenon Ray Pass Box and ultraviolet Pass Box [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(3): 44-49.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.03.008

高通量氙光传递窗与紫外传递窗灭菌效果观察

许琦^{1#}, 赵月^{1#}, 黄伟健¹, 宋琳亮¹, 康生², 刘毅², 和君^{1*}, 傅江南^{1*}

(1.暨南大学实验动物管理中心,广州 510632; 2.西安富康空气净化设备工程有限公司 西安 710000)

【摘要】 目的 传递窗作为实验动物屏障设施内物品传递的通道,主要是通过紫外灯照射物品表面达到消毒目的。针对其照射时间长、使用频率高、影响因素复杂、且消毒效果不稳定等问题,本研究对比了紫外传递窗和高通量氙光传递窗在不同时间点的杀菌效果。**方法** 比较分析两种传递窗在不同的时间点对 5 种标准菌株(金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌)的杀菌效果。**结果** 高通量氙光传递窗 1 min 杀菌率达 99.85%,5 min 可达 100%;紫外传递窗 5 min 达不到杀菌效果,对不同菌种灭菌效率差异大,照射 30 min 杀菌率方可达 99.91%。**结论** 与传统的紫外传递窗相比,高通量氙光传递窗 5 min 即可达到杀菌效果,它有望替代紫外传递窗。

【关键词】 传递窗;紫外灯;氙气灯;杀菌效果;5 种标准菌株

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 03-0044-06

Comparison of sterilization effect between High-throughput Xenon Ray Pass Box and ultraviolet Pass Box

XU Qi^{1#}, ZHAO Yue^{1#}, HUANG Weijian¹, SONG Linliang¹, KANG Sheng², LIU Yi², HE Jun^{1*}, FU Jiangnan^{1*}

(1. Institute of Laboratory Animal Science, Jinan University, Guangzhou 510632, China.

2. Xi'an Fukang Air Purification Equipment and Engineering Co.Ltd., Xi'an 710000)

【Abstract】 Objective Pass-through box, also called pass-through chambers and pass-through windows, allow for the transfer of parts and equipment into and out of a barrier facility. The common use of pass-through box is to sterilize the materials under the exposure of UV radiation. The traditional UV lamps need long time exposure, but the effect is not stable. A xenon (Xe) arc lamp is a specialized type of gas-discharge lamp that produces light by passing electricity through ionized xenon gas at high pressure and emit radiant energy within the UV-C band. In this study, the bactericidal efficacy of ultraviolet pass box and high-throughput xenon ray pass box was compared at indicated time points. **Methods** After the exposure of the two types of devices at indicated time points respectively, the effects on the *staphylococcus aureus*, *pseudomonas aeruginosa*, *escherichia coli*, *candida albicans* and *bacillus subtilis* were tested. **Results** The efficiency of the

[基金项目] 广东省自然科学基金面上项目(2019A151011994);广东省科技计划项目(2016A030303013);广东卫生厅医学科研基金(A2018391)。

[作者简介] 许琦(1993—)女,本科生,研究方向:实验动物学。E-mail: xuqi2017kate@163.com

赵月(1986—)女,实验师,研究方向:实验动物病理学。E-mail: tsukimoon@126.com #共同第一作者

[通信作者] 和君(1984—)女,高级实验师,研究方向:病原学。E-mail: shadow.fion@163.com

傅江南(1959—)男,副研究员,研究方向:实验动物学。E-mail: fujiangnan126@126.com *共同通信作者

xenon arc lamps was 99.85% with 1-min exposure and 100% with 5-min exposure; The sterilization efficiency of traditional UV lamps below quality in 5 minutes, and the sterilization efficiency of different bacteria varied greatly. However, the sterilization efficiency is about 99.91% after 30-min irradiation duration. **Conclusions** The efficiency of the xenon arc lamps can achieve bactericidal effect in 5 minutes, and could replace the UV lamps in the future.

[Keywords] pass-through box; ultraviolet lamp; high-throughput Xenon Ray; sterilizing effect; five standard strains

传递窗作为实验动物屏障设施内物品传递的通道上的一种重要杀菌设备,主要用于洁净区与非洁净区、洁净区与洁净区之间物品的传递,以避免其受到环境的污染。常用的传递窗是利用紫外线(波长在 225~275 nm,峰值 253.7 nm)照射,产生能量传递和积累而达到破坏微生物核酸的目的^[1]。紫外传递窗杀菌效果与紫外线的输出能量、灯的类型、光的强度和使用时间有关。一旦紫外灯管老化,它将丧失 30%~50%的光照强度,杀菌能力大打折扣^[2]。为此,我国国家标准 GB19258《紫外线杀菌灯》指出紫外灯杀菌最佳时间为 30 min^[3-4]。但在实际应用中,尤其是在人流、物流量大的科研中心或动物中心,使用 30 min 的照射时间,将很大程度上限制屏障环境的进出效率,影响工作效率。针对紫外灯传递窗灭菌效果受多种因素影响且耗时较长的问题,本研究关注一种新型高通量氙光传递窗,它利用脉冲氙灯极化发光的原理,通过产生强烈的脉冲紫外光线,可快速对物品表面和空气中的各类微生物进行灭活^[5]。本研究针对细菌繁殖体(金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、大肠杆菌)^[6-8]、细菌休眠体(枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢体)^[9]、真菌(白色念珠菌)^[10]这 3 种微生物形态的 5 种标准菌株经传递窗不同时间点的照射,通过与传统紫外传递窗的杀菌效果进行对比分析,从而得到杀菌效果的评价。

1 材料和方法

1.1 实验材料

菌种:金黄色葡萄球菌(简称金葡, ATCC6538)、绿脓杆菌(简称绿脓, ATCC15442)、大肠杆菌(简称大肠, ATCC8099)、白色念珠菌(简称白念, ATCC10231)均购自广东环凯微生物有限公司;枯草芽孢杆菌黑色变种芽孢菌片(简称枯草 ATCC9372)购自北京鑫四环消毒技术开发有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

脑心浸液培养基 BHI(海博生物技术有限公司);营养琼脂胰蛋白胨大豆琼脂 TSA(海博生物技术有限公司);马铃薯葡萄糖琼脂 PDA(环凯生物技术有限公司);营养琼脂 NA(环凯生物技术有限公司);TSB(海博生物技术有限公司);胰蛋白胨生理盐水溶液(TPS)由本实验室制备。生物梅里埃公司 DENSIMAT 细菌浊度仪, MX-F 涡旋仪, 日本三洋 MIR-262 恒温培养箱, 传统紫外传递窗(UVPB), 高 90 cm×宽 80 cm×长 60 cm, 配置 20 W 紫外线消毒灯 6 支, 每支灯管平均辐照度为 75.01 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。FX-XB-D800 高通量氙光传递窗(XePB), 高 90 cm×宽 82 cm×长 88 cm(西安某公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌悬液的制备

按照卫生部法监发[2002] 282 号^[11], 复苏菌种后, 菌种培养至第四代(不同菌种的培养时间及温度有所不同, 详见所购菌种的微生物检测冻干质控菌种使用说明书), 挑取菌落接入 5 mL TSB 营养肉汤中, 涡旋仪涡旋震荡 20 s, 制成菌悬液备用, 枯草芽孢杆菌本身即为黑色变种芽孢菌片, 直接洗脱制成芽孢悬液。为便于活菌计数, 细菌浊度仪读取菌悬液浓度;金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌菌悬液浓度取 0.7~1.4 Mcf(麦氏浊度);白色念珠菌菌悬液浓度取 6.9 Mcf。

1.3.2 菌片的制备

滴片法, 将灭菌后的 10 mm×10 mm 玻片平铺于无菌平皿, 逐片滴加 10 μL 菌液, 自然风干后制成菌片。

1.3.3 传递窗杀菌检测

将菌片平置于无菌平皿中, 盖上编号, 平板放置数量参考医药工业洁净室区沉降菌的测试方法中的相关规定^[12], 传递窗内中线左右各三分之一处分别放入 1 皿, 高通量氙光传递窗照射时间设定 1 min、3 min、5 min;传统紫外传递窗设定照射时间设

定 5 min、30 min 进行检测。

1.3.4 洗脱培养

照射后将菌片加入 5 mL TPS 中涡旋洗脱,取 1 mL 洗脱液于无菌培养皿,同时每皿倒入 50℃, 15 mL配置好的 TSA 培养基,白色念珠菌需倒入 PDA 培养基,凝固后,按各菌种适宜的培养条件分别进行培养。为防止菌落数过多不便于活菌计数,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌阳性菌片洗脱液需按照 10⁻⁴与 10⁻⁵比例稀释后倒板;白色念珠菌阳性菌片洗脱液 10⁻³与 10⁻⁴稀释后倒板;枯草芽孢杆菌阳性菌片洗脱液 10⁻¹与 10⁻²稀释后倒板。

1.3.5 活菌计数

阳性平板菌落数乘以稀释倍数,即得到每毫升洗脱液中细菌数量(N0)。实验组进行活菌计数,平皿长菌数为对应样每毫升洗脱液中细菌数:

杀菌率=(N0-NX)/N0×100%

式中:N0 为每毫升洗脱液中细菌数量,NX 为照射后每毫升菌片洗脱液中活菌个数。每组重复 3 次,取平均杀菌率。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 7 软件处理数据、作图,计量数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$),组间差异采用 one-way ANOVA 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细菌繁殖体的抑菌率

紫外传递窗灯管为 6 根环绕式,其到菌片的直线距离分别为 30 cm、52 cm 和 60 cm,均在表面消毒的有效范围内^[13],因此本研究不单列不同的距离对杀菌效果的影响。此外,为对传递窗杀菌效率进行比较,高通量氙光传递窗的建议工作时长 1 min、3 min、5 min,特选紫外传递窗的时长为 5 min 及最佳工作时长 30 min 进行比较。高通量氙光传递窗照射 1~5 min 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及绿脓杆菌的平均杀菌率均可达 99.99%以上。紫外传递窗照射 5 min 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌无明显杀灭效果;照射 30 min 对金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌方可达到高通量氙光传递窗照射 1 min 的杀菌率;照射 30 min 对大肠杆菌杀灭率达 99.91%。

具体数据见表 1、图 1、图 2。

2.2 照射对细菌休眠体的杀灭情况

高通量氙光传递窗照射 1 min 对枯草芽孢杆菌的杀菌率达 99.96%,照射 3 min、5 min 可达 100.00%。紫外传递窗照射 5 min 对枯草芽孢杆菌的杀灭率仅为 45.20%,照射 30 min 杀菌率大于 99.99%具体数据见表 2、图 3。

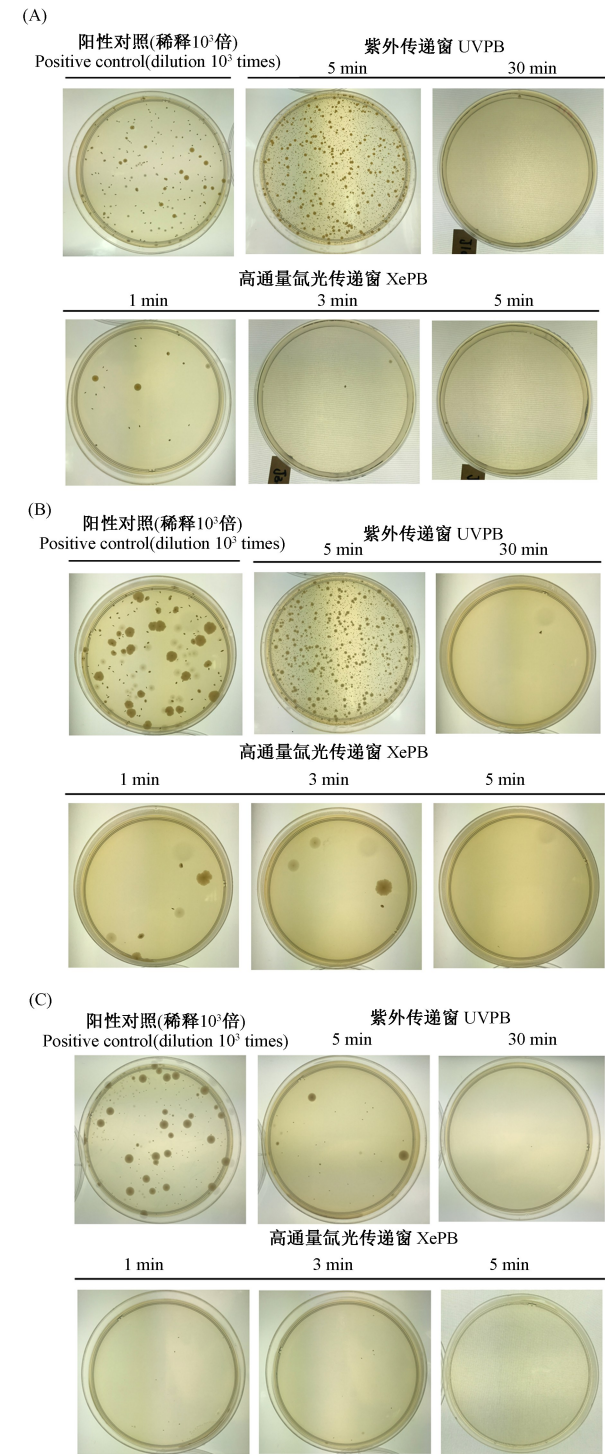
2.3 照射对真菌的杀灭情况

高通量氙光传递窗照射 1 min、3 min 对白色念珠菌的平均杀菌率达 99.97%,照射 5 min 杀菌率可达 100.00%。紫外传递窗照射 5 min 对白色念珠菌无明显杀灭效果,照射 30 min 杀菌率达 100.00%。具体数据见表 3、图 4。

表 1 高通量氙光传递窗与紫外传递窗对 3 种细菌繁殖体的杀灭情况

Table 1 Sterilization effects of High-throughput Xenon Ray Pass Box and ultraviolet Pass Box on the three bacteria							
细菌类型 Microbial types	高通量氙光传递窗 XePB			紫外传递窗 UVPB			菌株浓度 (CFU/mL)
	照射时间 Exposure time	菌落数 Colony forming units	杀菌率 Sterilizing rate	照射时间 Exposure time	菌落数 Colony forming units	杀菌率 Sterilizing rate	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	1 min	5.57±1.99	>99.99%	5 min	>300	—	4×10 ⁵
	3 min	2.2±1.48		30 min	6±2.19	>99.99%	
	5 min	2.39±1.76					
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	1 min	6±1.94	>99.99%	5 min	>300	—	5×10 ⁴
	3 min	4±3.59		30 min	46.25±10.30	99.91%	
	5 min	0.5±0.52					
绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 min	1.67±0.82	>99.99%	5 min	129±47.48	99.74%	2×10 ⁵
	3 min	1.33±1.51		30 min	0.5±0.58	>99.99%	
	5 min	0.17±0.41					

注:独立重复 3 次实验,测试样品 n=6,阳性菌株 n=4。
Note. Repeat 3 experiments independently. Testing sample n=6, Positive strain n=4.

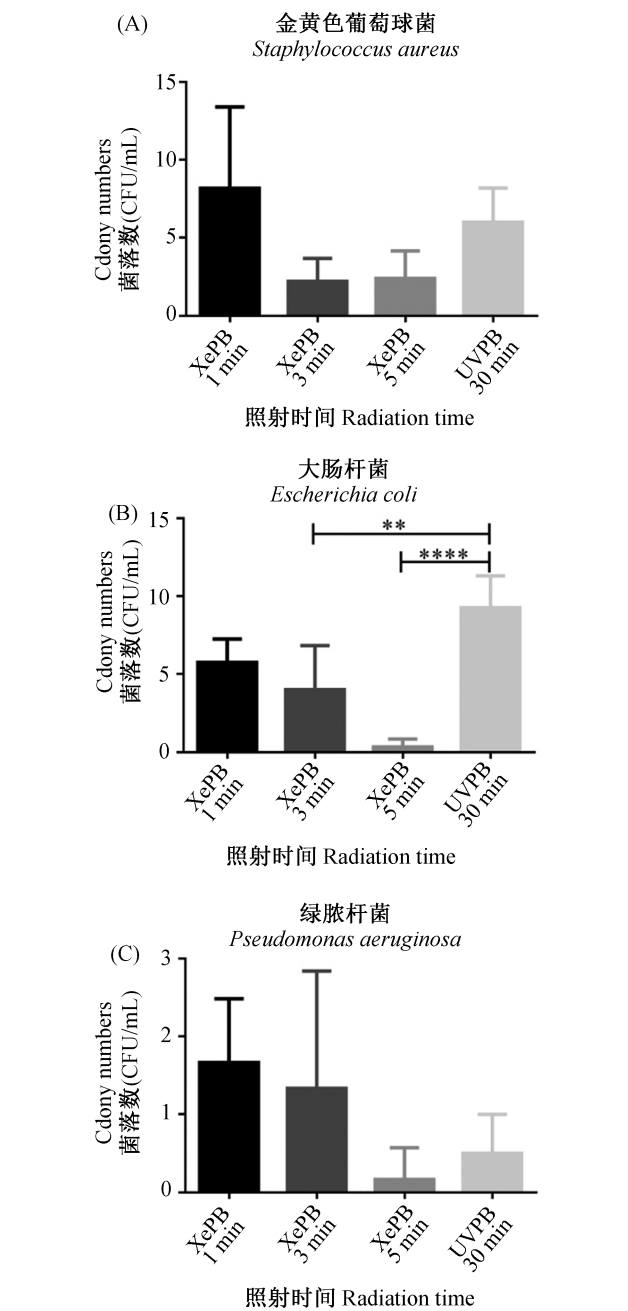


注: A;金黄色葡萄球菌;B:大肠杆菌;C:绿脓杆菌;阳性对照:阳性洗脱液稀释后铺板,培养 48 h。

图 1 紫外传递窗和高通量氙光传递窗在不同照射时间点对金葡、大肠、绿脓的悬液涂布照射结果

Note. A, *Staphylococcus aureus*. B, *Escherichia coli*. C, *Pseudomonas aeruginosa*. Positive control, The positive eluent was cultured 48 h after dilution.

Figure 1 Result of radiation of High-throughput Xenon Ray Pass Box and ultraviolet Pass Box on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* at different time points



注: A、B、C:高通量氙光传递窗(XePB)照射 1 min、3 min、5 min,紫外传递窗(UVPB)照射 30 min 后金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌菌片洗脱液的含菌数。** $P<0.01$;**** $P<0.0001$ 。

图 2 紫外传递窗和高通量氙光传递窗在不同照射时间点对金葡、大肠、绿脓的差异分析

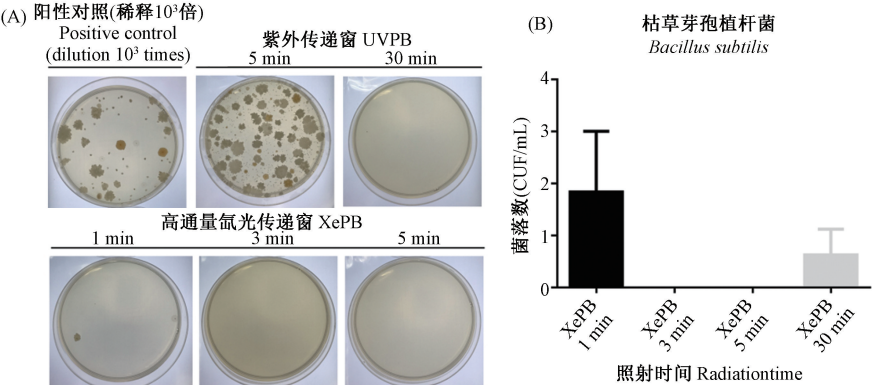
Note. A, B, C, The number of bacteria in the eluent of *staphylococcus aureus*, *escherichia coli* and *pseudomonas aeruginosa* after 1, 3 and 5 min of high-throughput xenon light pass box irradiation and 30 min of uv light pass box irradiation

Figure 2 Difference analysis of High-throughput Xenon Ray Pass Box and ultraviolet Pass Box on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* at different time points

表 2 高通量氙光传递窗与传统紫外传递窗对枯草芽孢杆菌的杀灭情况

芽孢 Spore	高通量氙气传递窗 XePB			紫外传递窗 UVPB			菌株浓度 (CFU/mL)
	照射时间 Exposure time	菌落数 Colony forming units	杀菌率 Sterilizing rate	照射时间 Exposure time	菌落数 Colony forming units	杀菌率 Sterilizing rate	
枯草芽孢 <i>Bacillus subtilis</i>	1 min	1. 833±1. 30	99. 96%				4 * 10 ³
	3 min	0	100%				
	5 min	0		5 min	1808±52. 9	45. 20%	
				30 min	0. 75±0. 5	>99. 99%	

注:独立重复 3 次实验,测试样品 $n=6$,阳性菌株 $n=4$ 。
Note. Repeat 3 experiments independently. Testing sample $n=6$, Positive strain $n=4$.



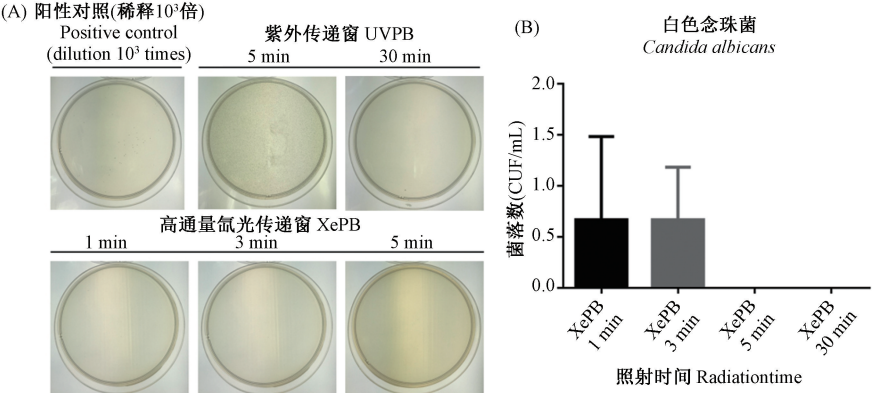
注:A:悬液涂布照射结果;阳性对照:阳性洗脱液稀释后铺板,培养 72 h;B:差异分析。
图 3 紫外传递窗和高通量氙光传递窗在不同照射时间点对枯草芽孢的杀灭情况
Note. A, Result of radiation. Positive control, The positive eluent was cultured 72 h after dilution. B, Difference analysis.

Figure 3 Result of radiation of High-throughput Xenon Ray Pass Box and ultraviolet Pass Box on *Bacillus subtilis* at different time points.

表 3 高通量氙光传递窗与紫外传递窗对白色念珠菌的杀灭情况

真菌 Fungus	高通量氙气传递窗 XePB			紫外传递窗 UVPB			菌株浓度 (CFU/mL)
	照射时间 Exposure time	菌落数 Colony forming units	杀菌率 Sterilizing rate	照射时间 Exposure time	菌落数 Colony forming units	杀菌率 Sterilizing rate	
白色念珠菌 <i>Candida albicans</i>	1 min	0. 67±0. 82	99. 97%				3 * 10 ³
	3 min	0. 67±0. 52	100%				
	5 min	0		5 min	>300	—	
				30 min	0	100%	

注:独立重复 3 次实验,测试样品 $n=6$,阳性菌株 $n=4$ 。
Note. Repeat 3 experiments independently. Testing sample $n=6$, Positive strain $n=4$.



注:A:悬液涂布照射结果;阳性对照:阳性洗脱液稀释后铺板,培养 72 h;B:差异分析。
图 4 紫外传递窗和高通量氙光传递窗在不同照射时间点对白色念珠菌的杀灭情况
Note. A, Result of radiation. Positive control, The positive eluent was cultured 72 h after dilution. B, Difference analysis.

Figure 4 Result of radiation of High-throughput Xenon Ray Pass Box and ultraviolet Pass Box on *Candida albican* at different time points

3 讨论

洁净环境是确保无菌产品生产的重要影响因素^[14],传递窗作为屏障设施内的一种常用的辅助设备,能最大限度的降低洁净区的污染^[5],对解决各种生物安全问题起到不可忽视的重要作用。紫外线消毒杀菌是物体表面消毒的常用方法,此法经济、实惠、方便。但其最佳消毒时间一般为 30 min,如果大量实验人员要进入洁净区,往往需要等待较长时间,有时甚至个别实验人员在未彻底杀菌后就将传递窗内的物品传入洁净区,增加了洁净区病原微生物感染的风险,同时也对实验人员和环境造成威胁。本文通过对紫外传递窗和高通量氙光传递窗对 5 种病原的不同照射时间对杀灭效果的影响进行实验,探讨不同类型传递窗的杀菌效果。

本文选取的 5 种菌株分别是金黄色葡萄球菌,它是细菌繁殖体中化脓菌的代表^[6];绿脓杆菌,是医院感染中最常分离的细菌繁殖体的代表^[7];大肠杆菌,是细菌繁殖体中肠道菌的代表^[8];白色念珠菌,是空气中真菌的代表^[9];枯草芽孢杆菌,是黑色变种芽孢为细菌休眠体的代表^[10],这 5 种菌是实验动物中心的常见菌,也是《消毒产品消毒效果检验技术规范》里规定检测灭菌效果的必备菌株,绿脓杆菌与金黄色葡萄球菌更是 CL 级以上动物的常见污染菌^[15]。紫外传递窗照射 5 min 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌无明显杀灭效果,对绿脓杆菌的杀灭率仅为 45.20%,不同菌种间的差异大,对紫外光敏感度高的菌体短时间内被杀灭率较高^[16],照射 30 min 对 5 种菌杀菌率达 99.91% 以上。高通量氙光传递窗 1 min 能对 5 种菌造成 99.85% 以上的杀菌率,5 min 杀菌率可达 100%,效果明显好于传统的紫外传递窗,且具有高效的特点。在人员流动性大、物品传递频繁的动物中心,实验动物的生存环境条件稳定与否将会直接决定着动物实验数据的质量^[17],高通量氙光传递窗不仅为物品传递和人员进出节省了时间,降低了洁净区的感染风险。此外,采用的氙气为惰性气体,不含汞,不污染环境。脉冲氙灯的寿命约为 500 h^[5]、激光光束质量好、稳定等优点(寿命期内其光谱能量分布几乎不变^[18-20]),需注意的是高通量氙光灯工作的频闪阶段应避免直视传递窗^[18]。

高通量氙光传递窗利用高压氙气短时间内(10~100 ms)产生紫外线脉冲的原理,较传统紫外传递窗汞原子激发释放紫外光,通过各方面对比,其高效的杀菌能力,有望替代紫外传递窗,可更好的保障屏障环境、隔离污染,实现洁净区的高效运作。

参考文献:

- [1] 严浩. 紫外线消毒灭菌(UVGI)与(过滤+UVGI)洁净技术[J]. 机电信息, 2009, 239(29): 3-9.
- [2] 王静. 污水处理中紫外线消毒试验研究[D]. 山东建筑大学, 2012.
- [3] 中华人民共和国卫生部. GB19258-2012 紫外线杀菌灯[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [4] 赵慧, 刘燕, 李晨曦, 等. 传递窗紫外灯杀菌过程的探讨[J]. 标准科学, 2019, 121(1): 146-148.
- [5] 白冰, 王新华, 康生, 等. 高能氙光传递窗的杀菌效果研究[J]. 实验动物科学, 2016, 33(4): 74-77.
- [6] Moen SH, Ehrnström B, Kojen JF, et al. Human toll-like receptor 8 (TLR8) is an important sensor of pyogenic bacteria, and is attenuated by cell surface TLR signaling[J]. Front Immunol, 2019, 10: 1209.
- [7] Cardozo C, Rico V, Agüero D, et al. Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Rev Esp Quimioter, 2019, 32: 32-34.
- [8] Duan Q, Xia P, Nandre R, et al. Review of newly identified functions associated with the heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. front cell infect microbiol [J]. 2019, 9: 292.
- [9] Lu Y, Su C, Ray S, et al. CO₂ Signaling through the Ptc2-Ssn3 axis governs sustained hyphal development of *Candida albicans* by reducing Ume6 phosphorylation and degradation [J]. MBio, 2019, 10(1). pii: e02320-18.
- [10] Black EP, Koziol-Dube K, Guan D, et al. Factors influencing germination of *Bacillus subtilis* spores via activation of nutrient receptors by high pressure [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(10): 5879-5887.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范: 2.1 消毒产品消毒效果检验技术规范[S]. 卫法监发[2002]282号.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法: GB/T 16294-2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [13] 朱梅芬, 刘连生, 陈天培, 等. 实验动物微生物学质量控制的实验性探讨[J]. 实验动物与比较医学, 1996, 16(2): 67-71.
- [14] 孔繁贞, 冯建萍, 魏绍振, 等. 紫外线对微生物消毒效果的影响因素及质控措施[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2017, 47(2): 64-66.
- [15] 陈王露, 陈青青, 孙志勇, 等. 对无菌生产洁净环境验证与监控的讨论[J]. 生物化工, 2018, 4(3): 16-20.
- [16] 汪兵利. KW 公司大功率紫外线杀菌灯项目商业计划书[D]. 华南理工大学, 2012.
- [17] 李超, 张惠, 梁洋洋, 等. 化学消毒剂在实验动物设施中的应用及职业健康防护[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(8): 11-15.
- [18] Dibowski G, Esser K. Hazards caused by UV rays of xenon light based high performance solar simulators [J]. Saf Health Work, 2017, 8(3): 237-245.
- [19] Fgaier S, de Almeida Lopes MM, de Oliveira Silva E, et al. Xenon lamps used for fruit surface sterilization can increase the content of total flavonols in leaves of *Lactuca sativa* L. without any negative effect on net photosynthesis. PLoS One, 2019, 14(10): e0223787.
- [20] Zhao Y, Guo D, Liu X, et al. Rapid measurement of spatial light distribution of a short-arc xenon flash lamp [J]. Appl Opt, 2016, 55(24): 6596-6600.