

培养基微波灭菌法探讨

赵文彬 顾祥云 陈清 程玉凤

(连云港市卫生防疫站)

徐锦康

(中国电子器件总公司 778 厂连云港分厂)

应用微波作为消毒灭菌方法,是近年来发展的一项新技术,已在食品工业和医药卫生的某些方面推广应用^[1]。本文试用微波对不耐高温或高压蒸气灭菌的含糖、血清等微生物培养基进行灭菌试验,结果报告如下。

材料和方法

1. ER-692 微波炉:系中国电子器件总公司 778 厂连云港分厂生产。该机电脑程序控制,具有温度传感器,微波输出功率 65—650W,工作频率 2450MHz。

2. 试验用培养基:按常法配制糖发酵,糖发酵血清水,克氏双糖,营养琼脂培养基。

3. 供试微生物和菌液的制备:除巨大芽孢杆菌(代号 63101)系卫生部药品生物制品检定所供给外,甲型副伤寒沙门氏菌等菌种均系本站细菌室保存菌种。

菌液的制备:将供试细菌分别接种于营养

琼脂斜面上,经 37℃ 培养过夜,刮取菌苔,用 pH 7.4 营养肉汤稀释成 1×10^8 个/ml 的菌悬液。巨大芽孢杆菌按上法培养,待镜检芽孢形成率达 80% 以上再刮取菌苔制成 1×10^8 个/ml 的芽孢菌液。黄曲霉菌则于试验前 4 日,接种于察氏改良琼脂平板上,28℃ 培养,刮取菌丝体和孢子制备菌液。

4. 实验方法:乳糖发酵培养基分装于 15×150 mm 的试管,每管 5ml; 250ml 容量的三角烧瓶,每瓶 100ml。克氏双糖及糖发酵血清水等培养基分装于 13×100 mm 的试管,每管约 2.5ml。营养琼脂分装在 500ml 三角烧瓶中,每瓶 300ml。凡按实验设计需污染细菌的均在微波灭菌实验前 10 分钟挑一接种环(直径 4mm)菌液接种到培养基中(最终浓度 4×10^5 个/ml)。塞好棉塞,包扎后放微波炉,温度探针插到一只有培养基的试管或三角烧瓶中。

采用功率、温度控制程序,按设计的温度和

表 1 不同温度微波照射 10 分钟对试验微生物的杀灭效果

菌种	50	60	75	85	95	对照
甲型副伤寒杆菌	-	-	-	-	-	++
福氏痢疾杆菌	-	-	-	-	-	++
大肠杆菌	++	++	-	-	-	++
黄曲霉菌菌丝	-	-	-	-	-	++
葡萄球菌	++	-	-	-	-	++
巨大芽孢杆菌芽孢	++	++	++	++	-	++

-: 为无菌生长; ++: 有菌生长。

时间进行灭菌实验,然后放 37℃ 培养。不同培养基灭菌试验均重复进行二次,同时设未经微波处理和高压蒸气灭菌的对照管。

结 果

(一) 不同温度、时间微波灭菌效果

将制备好的甲型副伤寒杆菌、福氏痢疾杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、黄曲霉菌和巨大芽孢杆菌芽孢等菌液分别装于 13 × 100 mm 试管中,每管 1ml,放微波炉不同温度,照射 10 分钟,而后划线接种于相应琼脂平板,培养 48 小时,从表 1 可见试验的几种微生物对微波的抵抗力不同。以芽孢杆菌最强,85℃ 10 分钟仍不能杀灭。

为选择最佳的灭菌时间与温度,将未灭菌的肉汤培养基(2.5ml/管),各接种一环黄曲霉菌孢子和巨大芽孢杆菌芽孢菌液,微波照射温度为 75℃、85℃,时间分别为 10、20 分钟。从表 2 可见在 75℃ 经微波处理 20 分钟仍不能达到灭菌目的,而 85℃ 20 分钟即达到杀灭霉菌孢子和芽孢的目的。

(二) 糖发酵培养基灭菌效果

1. 配制的葡萄糖、蔗糖及乳糖发酵培养基,按不同的容器(试管和三角烧瓶)分别进行灭菌。试验采用 75℃、85℃ 二种温度和不同的照射时间。实验表明在 85℃ 20 分钟可达到灭菌效果,两种容器灭菌效果一致(表 3)。37℃ 培养 72 小时无菌生长的糖发酵培养基继续放室温(20—30℃)观察二周仍未见有细菌生长。

2. 克氏双糖培养基,灭菌温度为 85℃,时

表 2 两种温度、不同时间杀灭芽孢和霉菌孢子结果

37℃ 培养 (h)	75		85	
	10	20	10	20
24	4/4	2/4	1/4	0/4
48	4/4	2/4	1/4	0/4

分母为接种管数,分子为有菌生长的管数,以下表均同此

表 3 糖发酵培养基微波灭菌效果

37℃ 培养 (h)	85					对照
	75	85				
时间 (min)	10	5	10	20	30	
24	5/5	4/10	1/10	0/10	0/10	4/4
48	5/5	4/10	1/10	0/10	0/10	4/4

表 4 克氏双糖培养基微波 85℃ 不同时间灭菌效果

37℃ 培养 (h)	10	20	30	对照
48	2/18	0/20	0/20	4/4
72	3/18	0/20	0/20	
120	3/18	0/20	0/20	
室温二周	3/18	0/20	0/20	

间分别为 10、20、30 分钟,结果该培养基经微波照射 20 分钟即达到灭菌目的(表 4)。

3. 糖发酵血清水培养基,因该培养基常法要求采用阿诺氏灭菌法 80℃ 流通蒸气灭菌 30 分钟,连续三天。本试验将分装有培养基的试

表5 微波对糖发酵血清水灭菌效果

温度和 时间 37°C 培养 (h)		70°C 20min		80°C 15min		80°C 30min		对 照
		未 染 菌	染 菌	未 染 菌	染 菌	未 染 菌	染 菌	
连续三次	24	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3/3
	48	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
	72	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
一次	72	0/5	2/5	0/5		0/5	0/5	

表6 微波灭菌和高压蒸气灭菌的培养基微生物生化结果

菌 种	灭菌法 糖发酵管	微 波				高 压 蒸 气			
		双 糖	葡	甘	蔗	双 糖	葡	甘	蔗
大肠杆菌		- / ⊕ H ₂ S ⁻	⊕	⊕	⊕	1 / ⊕ H ₂ S ⁻	⊕	⊕	⊕
甲型副伤寒杆菌		- / ⊕ H ₂ S ⁻	⊕	⊕	-	1 / ⊕ H ₂ S ⁻	⊕	⊕	-
鼠伤寒沙门氏菌		- / ⊕ H ₂ S ⁺	⊕	⊕	-	- / ⊕ H ₂ S ⁺	⊕	⊕	-
福氏痢疾杆菌		- / + H ₂ S ⁻	+	-	-	- / + H ₂ S ⁻	+	+	-

+: 产酸不产气; ⊕: 产酸产气; -: 不发酵 H₂S⁻: 不产生 H₂S H₂S⁺: 产生 H₂S

管,于微波灭菌前,取半数培养基管先接种一环巨大芽孢杆菌芽孢菌液(染菌管),其他培养基管不接种芽孢菌液(未染菌),10分钟后分别采用70°C 20分钟和80°C 15、30分钟微波照射连续三天,并设一次微波照射和未照射对照,实验表明80°C微波照射一次15分钟就能达到灭菌效果(表5),而不必采用连续三天的阿诺氏灭菌法。

(三) 微生物生长和生化试验

为验证微波灭菌后,微波对培养基成份如糖类有无分解,破坏作用,选择大肠杆菌等菌种分别接种糖发酵和双糖培养基,试验表明生化反应与常规高压蒸气灭菌(8磅15分钟)结果完全相符见表6。

定量分装肉汤培养基于试管中,分别用微波和高压蒸气灭菌,于两种灭菌法的培养基中,接种一环大肠杆菌或葡萄球菌菌液各5管,37°C培养,分别于2、4、6、8、18小时,用浊度

法比较细菌生长浓度,测细菌生长曲线未见有差别。

(四) 营养琼脂溶解试验

作菌落计数用的营养琼脂,在临用前一般放电炉或酒精灯上加热溶解,在加热中稍不注意琼脂培养基就因沸腾而溢出或三角烧瓶破裂,电炉亦易损坏。我们采用功率、温度(用功率和时间程序亦可)程序控制,根据需溶解的琼脂瓶数,功率用6—9,温度为95°C,经5—6分钟,琼脂培养基即可全部溶解,琼脂不溢出,操作方便,不需专人看管。

讨 论

各种含糖(醇)培养基因糖(醇)在高温呈不同程度的水解和变质。因此,须采取不同的灭菌方法^[2],有时温度不易掌握,过高造成糖类水解和变质,影响实验结果的准确性。本试验采

(下转第184页)

(上接第 179 页)

用微波照射 85℃ 20 分钟可达到培养基灭菌的目的,并可代替阿诺氏灭菌法。由于微波加热迅速,使炉内灭菌的培养基温度达到 85℃ 仅需 2—3 分钟,该机采用电脑程序控制,有温度自动控制装置,操作简便,省电,灭菌效果好。

丁兰英等^[3]用微波照射,在 92—95℃ 下作用 3 分钟即可达到杀灭蜡状芽孢杆菌芽孢,我们用 85℃ 20 分钟亦可达到杀灭巨大芽孢杆菌

芽孢,所试验的几种培养基在较低温度均能达到灭菌的效果。关于微波杀菌的机理,除了热效应外,还可能有非热效应,尚须进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 芝崎勋: 食品工业 18(4): 94, 1975。
- [2] 张宽厚: 细菌生理学, 第 240 页, 人民卫生出版社, 1964 年。
- [3] 丁兰英等: 消毒与灭菌, 1(2): 82, 1984 年。
- [4] 《消毒杀虫灭鼠手册》编写组: 消毒杀虫灭鼠手册, 第 32 页, 人民卫生出版社, 1980 年。