

快中子辐照对枯草芽孢杆菌的灭菌效果研究

陈晓明^{1,2} 谭碧生² 张建国² 郑春³ 罗娟² 孙颖⁴ 楚士晋² 任正隆¹

¹ (四川农业大学 雅安 625000)

² (西南科技大学 绵阳 621010)

³ (中国工程物理研究院核物理与化学研究所 绵阳 621900)

⁴ (中国工程物理研究院 绵阳 621900)

摘要 利用快中子脉冲堆(Chinese Fast Burst Reactor II, CFBR-II)产生的快中子,采用枯草芽孢杆菌黑色变种为材料,考查了中子辐射灭菌效果及剂量、剂量率、辐照温度、照射状态等辐射灭菌影响因素。结果表明,在剂量率为7.4Gy/min时的 D_{10} 值为384.6Gy,中子剂量与存活芽孢对数满足 $y=-0.0026x+10.462$ 的函数关系;在剂量为800Gy时,剂量率与存活芽孢对数满足 $y=7.7414x^{0.0834}$ 的函数关系;升高温度有利于中子辐射灭菌;中子辐照不同状态芽孢,其存活率为:菌片>粉末>液体。

关键词 枯草芽孢杆菌黑色变种,中子辐照,辐射灭菌,剂量率,辐照温度

中图分类号 Q691.5, Q93, Q939.99, TL99

发现电离辐射能杀灭微生物已有百年历史,但其实际应用却是自1956年美国Ethicon公司应用电子直线加速器对外科缝线的灭菌成功之后,电离辐射灭菌技术才迅速发展。我国20世纪80年代开始对医疗用品的辐照消毒与灭菌进行了大量研究,发展也很快。现在对辐照灭菌技术的研究和使用范围日益扩展,除对医疗卫生用品和食品的处理外,尚可见到对化妆品、日常生活用品、动物饲料及污水处理等的报道^[1]。

目前常用的电离射线主要为 γ 射线和电子束。近几年,美国军事放射生物研究所(Armed forces radiobiology research institute, AFRRI)提出了采用中子辐射对危险细菌和病毒进行灭菌处理,以期得到新的能用于辐射灭菌的资源^[2]。但目前对中子辐射灭菌的效果和影响因素了解较少。细菌芽孢具有耐热、耐辐射等抗性,常作为消毒灭菌的研究材料。中子按能量可划分为:热中子(<0.4eV),中能中子(1.4eV—200keV),快中子(200keV—20 MeV),高能中子(>20MeV)^[3]。本工作以枯草芽孢杆菌黑色变种为材料,通过设计不同剂量、不同剂量率、不同照射状态、不同辐照温度等中子辐照试验,研究快中子辐照灭菌效果及影响中子辐照灭菌的因素。

1 材料和方法

1.1 菌株

枯草芽孢杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis* var. *niger*, ATCC 9372),购于中国普通微生物菌种保藏中心,培养于营养肉汁液体培养基上。

1.2 快中子辐射源

本实验在中国工程物理研究院核物理与化学研究所的快中子脉冲堆(Chinese Fast Burst Reactor II, CFBR-II)上进行。CFBR-II堆是一个以浓缩铀为活性区,以贫化铀和铜为反射层的快中子脉冲堆。中子能谱近似裂变谱(见图1)。

堆外平均能量为1.12MeV,堆内平均能量为1.38MeV。该堆可以在两种工况下运行,一是超瞬发临界的脉冲工况运行;二是如一般反应堆的缓发临界的稳定功率运行。在稳定功率运行时,中子注量率不随时间而变化,爆发脉冲时中子注量率随时间呈脉冲式变化^[4]。本次实验是在稳定功率状态下运行。中子注量的测量采用硫活化片和金活化片同时进行。

中国工程物理研究院预研项目(052056)、四川省教育厅(2005C13)、西南科技大学引进人才项目(051103)资助

第一作者:陈晓明,女,1970年7月出生,2003年于四川农业大学获硕士毕业,现为四川农业大学生物化学与分子生物学专业在读博士,主要从事辐射生物学效应及防护,副教授

通讯联系人:任正隆

收稿日期:初稿 2007-01-29,修回 2007-03-16

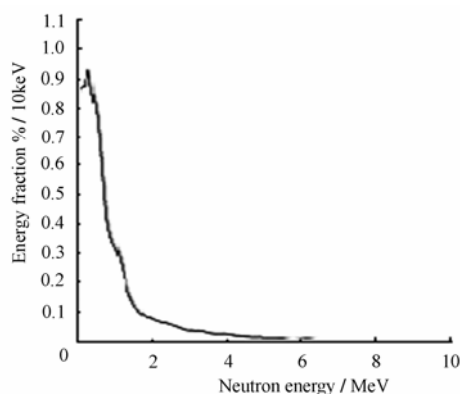


Fig.1 Neutron energy spectrum of CFBR-II

1.3 样品的制备

1.3.1 液体样品的制备 将枯草芽孢杆菌芽孢悬液置于 45℃ 的水浴中 24h, 使菌自溶断链, 分散成单个芽孢。再放于 80℃ 水浴中 20min, 以杀灭残余的繁殖体。离心, 磷酸盐缓冲液 (Phosphate buffer solution, PBS) 洗涤两次, 调整菌体浓度为 10^{10} cfu/mL。分装于 2mL 细胞冻存管 (聚丙烯材料, AXYGEN 公司), 保存于 4℃ 冰箱中备用。

1.3.2 菌片的制备^[5] 将灭菌的滤纸片平铺于无菌平皿内, 逐片滴加 50μL 菌液, 置于 37℃ 温箱内干燥, 将干燥的菌片放入 2mL 冻存管中, 保存于 4℃ 冰箱中备用。

1.3.3 粉末样品的制备 取液体样品 1.8mL 到 2mL 冻存管中, 冷冻干燥机 (OD-230, Thermo Electron Corporation) 中干燥 48h, 保存于 4℃ 冰箱中备用。

1.4 中子辐照对芽孢的灭菌效果研究

在中子剂量率为 7.40Gy/min, 剂量分别为 80Gy、200Gy、400Gy、555Gy、800Gy、2000Gy、4000Gy 下, 常温辐照液体样品。每批处理 3 个平行样品, 同时设空白对照, 辐照完毕尽快进行平板计数。将样品作倍比稀释到适当的浓度, 取 100μL 涂平板 (每个稀释度涂 3 个平板), 放入 37℃ 恒温培养箱培养 48h 后记数。平板菌落数在 30—300 个之间为有效数据, 以下均相同。

1.5 中子辐照剂量率对芽孢的灭菌影响研究

在中子剂量为 800Gy, 剂量率分别为 1.48 Gy/min、2.96Gy/min、7.4Gy/min、21.2Gy/min、39.2 Gy/min 下辐照液体样品。

1.6 温度对中子辐照灭菌的影响研究

在剂量为 500Gy、剂量率为 0.93Gy/min 下辐照

液体样品, 辐照温度分别为 $(2\pm 1)^\circ\text{C}$ 和 $(18\pm 0.5)^\circ\text{C}$ (常温), 其中 $(2\pm 1)^\circ\text{C}$ 采用冰为介质实现冷却。

1.7 不同菌体状态对中子辐照灭菌的影响

在剂量为 800Gy, 剂量率为 2.96Gy/min 下分别辐照液体、粉末和菌片样品, 辐照后分别进行平板记数。

2 结果

2.1 中子辐照对枯草杆菌芽孢的灭菌效果

在剂量率为 7.40Gy/min 时, 不同剂量中子射线辐照芽孢后活菌记数结果见图 2。存活菌数的对数 y 与剂量 X (Gy) 满足函数:

$$y = -0.0026x + 10.462, R^2 = 0.9105, D_{10} = 384.6 \text{ (Gy)}$$

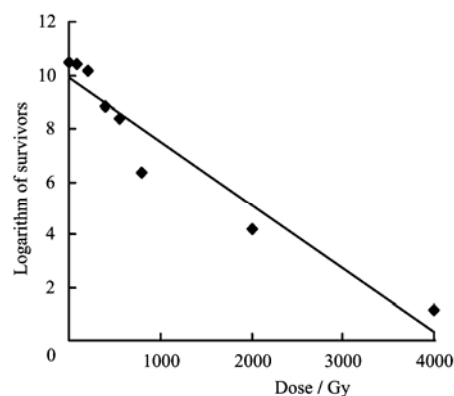


Fig.2 Neutron radiation sterilizing effect on *Bacillus subtilis* spores

2.2 中子辐照剂量率对芽孢的灭菌影响

在剂量为 800Gy 时, 不同剂量率中子射线对芽孢的辐照研究所得结果见图 3。存活菌数的对数 y 与剂量率 X (Gy/min) 满足函数:

$$y = 7.7414X^{-0.0834}, R^2 = 0.8889$$

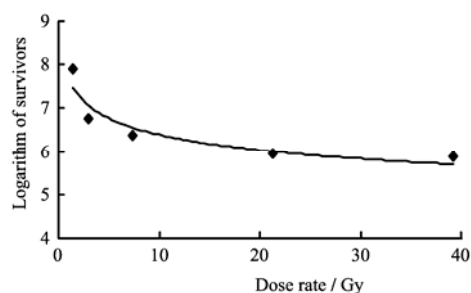


Fig.3 Neutron radiation dose rate effect on sterilizing

2.3 温度对中子辐射灭菌的影响

在中子剂量为 500Gy、剂量率为 0.93Gy/min 下辐照液体样品, 辐照温度分别为 $(2\pm 1)^\circ\text{C}$ 和 $(18\pm 0.5)^\circ\text{C}$, 结果见表 1。

Table 1 Temperature effect on neutron radiation sterilizing

Temperature/°C	Dose/Gy	Dose-rate/Gy·min ⁻¹	Survivor/CFU·mL ⁻¹	Survivor rate/%
2	500	0.93	1.32×10 ⁹	6.50
18	500	0.93	2.69×10 ⁸	0.93

2.4 菌体存在状态对中子辐照灭菌的影响

在相同剂量和剂量率条件下, 中子辐照对不同菌体存在方式的影响结果见图 4。

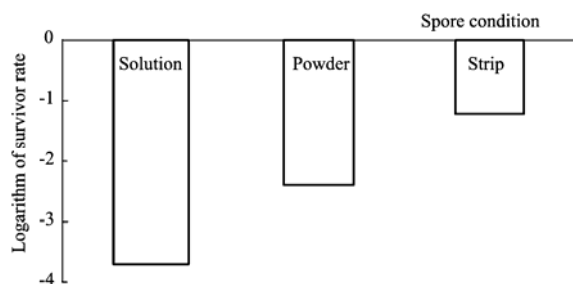


Fig.4 Spores condition effect on neutron radiation sterilizing

由图 4 可以看出, 在剂量为 800Gy、剂量率为

2.96Gy/min 下, 其存活率由大到小的顺序为菌片>粉末>液体。

3 分析和讨论

3.1 关于中子辐照剂量的确定

物质对中子的吸收剂量几乎与中子比释动能相当, 中子比释动能系数 k 又与被照物质的化学组成有关。在富氢介质中, 中子与氢相互作用所致比释动能是最主要的因素^[3]。因此, 在我们的计算中, 主要考虑了物质的含氢量。中子剂量率=中子注量率× k 。

由相关资料可得各种物质的主要化学组成如表 2 所示^[3,6]。

Table 2 Chemical composition of different material

Element percent /%	Material species					
	Water	Bacteria	Filter paper	Polymethyl methacrylate plastics	Thigh bone	Reference human
H	11.2	6.8~8	6.67	8.0	6.4	10.2
C	88.8	50	40	60.0	27.8	18.0
O	—	20	53.3	32.0	41.0	65.0
N	—	15	—	—	2.7	3.0

由于 CFBR-II 堆中子能谱与 ²⁵²Cf 裂变中子谱相当, 由参考人实测辐射腔外和辐射腔内 K 值分别为 0.228、0.235×10⁻¹⁰Gy·cm²。根据《剂量测试技术手册》表 16-1, 得到实际各材料的比释动能系数 k 取值 (见表 3)。

Table 3 The kerma coefficient (k) of material (×10⁻¹⁰Gy·cm²)

Neutron energy /MeV	Solution	Powder	Strip
1.12(Outside cavity)	0.250	0.193	0.151
1.38(Inside cavity)	0.258	0.199	0.155

3.2 中子辐射灭菌效果比较

本研究得出在剂量率为 7.4Gy/min 时 D_{10} 值为 384.6Gy。有资料显示, γ 射线灭活枯草芽孢杆菌的 D_{10} 值为 1.7—2.5kGy^[1,7], 王勇等^[8]采用 26.51Gy/min 电子束灭菌短小芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌, 其 D_{10}

值分别为 1.83 kGy 和 2.23kGy。因此, 可初步得出快中子射线对微生物的损伤效应比 γ 射线和电子束强。这是由于中子属于高传能线密度 (Linear energy transfer, LET) 辐射, 它与组织作用时每微米可失去几十到几百 keV 的能量, 而 γ 射线属于低 LET 辐射, 在组织中每微米只损失几 keV 能量。因此, 中子很容易造成生物体细胞内产生大量的难以修复的 DNA 双链断裂, 从而引起细胞的死亡。这也与 Schmid 等^[9] 和 Hacker 等^[10] 分别报道中子辐射对人淋巴细胞和鼠精细胞产生的生物损伤效应比 γ 射线更强结论一致。Singh 等^[11] 曾研究了中子和 γ 射线对 M13 噬菌体的灭活效果, 发现中子比 γ 射线的灭活效应要强得多。但美国军事放射生物研究所的 Lowy 等^[12] 曾以流感病毒为模型, 研究了快中子和 γ 射线辐照病毒的相对生物学效应和破坏机理。结果发现 γ 射线对流感病毒的灭活效果是中子的 2—3 倍。此结果和我们的结果正好

相反。这有可能与采用的研究物质(流感病毒遗传物质为RNA)、靶大小和辐射条件(如温度、剂量率等)有关。

3.3 中子剂量率对芽孢存活率的影响

从图3我们可以看到,芽孢存活率随中子辐照剂量率的增加而减小,这是由于辐照灭菌效果不仅与剂量有关,也与灭菌剂量率有关。一般,剂量率越高,微生物越易死亡。但也并非剂量率越高越好。在我们后期的研究中,发现当中子剂量率高达73.4Gy/min时,灭菌效果反而比低剂量率减小的现象,在我们研究中子辐射对DNA的损伤时,也发现了这种现象(另文报道)。而在低剂量和低剂量率条件下,这种辐照效应与剂量率相反的情况早有发现,人们将这种现象称为反剂量率效应(Inverse dose-rate effects)^[13]。就其原因,还有待讨论。

3.4 辐照温度对中子灭菌的影响

从表1中可以看出,在相同的辐照剂量和剂量率条件下,辐照温度为2℃时,芽孢存活率为18℃时的大约7倍。这可能是因为电离射线灭菌的机理主要可分为直接作用和间接作用,直接作用指射线直接破坏微生物的核酸、蛋白质和酶等生命攸关的物质。间接作用指射线作用于微生物时,其中的水分子等辐解产生自由基,自由基再作用于生命物质而使微生物死亡。在低温条件下,生物物质自由基的产生和反应活性被抑制,从而使辐射灭菌效果减小^[14]。

3.5 照射样品状态对芽孢存活率的影响

从图4我们可以看出,其存活率由大到小的顺序为菌片>粉末>液体。这可能也与杀菌机理中的间接作用有关。由于菌体所处的状态不同其含水量就不同,那么辐射所引发的自由基数量就不同。液体含水量最多,间接作用最强。而同样在干燥状态下,菌片由于介质的包被而受到保护。因此,菌片的存活率比粉末存活率高。

最近 Shintani^[15]提出,微生物的伤害仅仅是在适合未损伤微生物的生长条件下没有生长能力而已。这种不能生长的原因很复杂,可能是受损的微生物对营养条件和环境条件要求更敏感,如培养时间、温度或要求一些特殊的化学成分如卤素等。因此他们将这种受损的微生物称为亚致死细胞,一旦条件许可,这些细胞将继续生长,这种观点可能将

带给灭菌学领域一个大的震撼。

参考文献

- 1 张文福. 医学消毒学. 北京: 军事医学科学出版社, 2002. 114-122
ZHANG Wenfu. Medicine Disinfection. Beijing: Military Medicine Science Press, 2002. 114-122
- 2 Gázsó L G, Ponta C C. Radiation Inactivation of Bioterrorism Agents. Netherlands: ISO Press, 2005. 153-160
- 3 计量测试技术手册编辑委员会. 计量测试技术手册. 电离辐射. 中国计量出版社, 1997. 618-702
Editor Committee of the Handbook of Measurement and Testing. Handbook of Measurement and Testing. Ionization Radiation. Beijing: China Metrology Press, 1997. 618-702
- 4 郑春. 核电子学与探测技术, 2001, 21(4): 307-309
ZHENG Chun. Nucl Electron Detect Technol, 2001, 21(4): 307-309
- 5 Borick P M, Fogarty M G. Applied Microbiology, 1967, 15(4): 785-789
- 6 岑沛霖, 蔡谨. 工业微生物学. 北京: 化学工业出版社, 1992. 60-61
CEN Peilin, CAI Jin. Industry Microbiology. Beijing: Chemical Industry Press, 1992. 60-61
- 7 Furuta M, Suwa T, Kuwabara Y, et al. Exp Anim, 2002, 51(4): 327-334
- 8 王勇, 李成林, 张文福, 等. 辐射防护通讯, 2003, 23(4): 32-34
WANG Yong, LI Chenglin, ZHANG Wenfu, et al. Radiat Protect Bull, 2003, 23(4): 32-34
- 9 Schmid E, Regulla D, Guldbakke S, et al. Radiat Res, 2002, 157(4): 453-460
- 10 Hacker-Klom U B, Kohnlein W, Kronholz H L, et al. Radiat Res, 2000, 153(6): 734-742
- 11 Singh S P, Cohen D, Dytlewski N, et al. Radiat Res, 1990, 31(4): 340-353
- 12 Lowy R J, Vavrina G A, Labarre D D. Antiviral Research, 2001, 52(3): 261-273
- 13 Koufen P, Brdiczka D, Stark G. Int J Radiat Biol, 2000, 76(5): 625-631
- 14 Nakauma M, Saito K, Katayama T, et al. Food Prot, 2004, 67(11): 2538-2543
- 15 Shintani H. Biocontrol Science, 2006, 11(3): 91-106

Study on the sterilizing effects of fast neutron radiation on *Bacillus subtilis*

CHEN Xiaoming^{1,2} TAN Bisheng² ZHANG Jianguo² ZHENG Chun³
LUO Juan² SUN Ying⁴ CHU Shijin² REN Zhenglong¹

¹ (Sichuan Agriculture University, Yaan 625000)

² (Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010)

³ (Institute of Nuclear Physics and Chemistry' China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621900)

⁴ (China Academy of Engineering Physics, Mianyang 621900)

ABSTRACT In order to investigate the neutron radiation sterilizing effect and influence factors including dose, dose rate, temperature and spore state, the *Bacillus subtilis* var. *niger* spore were irradiated by the fast neutron radiation produced from Chinese Fast Burst Reactor II. The plate-count results indicate that the D_{10} value is 384.6Gy with the neutron radiation dose rate of 7.4Gy/min and the correlation between the dose and logarithm of survivors meets the function $y=-0.0026x+10.462$. When neutron dose kept 800Gy, the correlation between the dose rate and logarithm of survivors meets the function $y=7.7414x^{-0.0834}$; spore livability declines under a high radiation temperature. The spore livability order is spore strip > spore powder > spore solution at the same neutron radiation. The conclusion can be made that neutron radiation has a higher sterilization effect than gamma ray and electron beam.

KEYWORDS *Bacillus subtilis* var. *niger*, Neutron radiation, Radiation sterilizing, Dose rate, Radiation temperature

CLC Q691.5, Q93, Q939.99, TL99