

【论 著】

过硫酸氢钾复合盐对禽类常见细菌病原微生物杀灭效果观察

王 娟,袁建丰,王贵平

(广东海大畜牧兽医研究院有限公司,广东广州 511400)

摘要 **目的** 观察过硫酸氢钾复合盐对禽类常见细菌病原微生物的杀灭效果,为禽类圈舍消毒提供依据。**方法** 采取悬液定性和定量方法,评估过硫酸氢钾复合盐杀灭大肠杆菌、鸭疫里默杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门菌效果,并比较 10 ℃、20 ℃ 和 30 ℃ 试验温度对消毒剂杀灭大肠杆菌和沙门菌试验效果的影响。**结果** 以杀灭细菌对数值 >5.00 的评价标准判断,5 min 内过硫酸氢钾复合盐杀灭大肠杆菌、鸭疫里默杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门菌时的最低杀灭浓度(活性氧含量)分别为 230 mg/L、14.375 mg/L、57.5 mg/L 和 115 mg/L,试验温度 10 ℃ 上升至 30 ℃,过硫酸氢钾复合盐对大肠杆菌和沙门菌的杀菌效果明显升高。**结论** 过硫酸氢钾复合盐对禽类常见细菌病原微生物有较好的杀灭效果,升高温度有助于提高过硫酸氢钾复合盐的杀灭效果。

关键词 过硫酸氢钾复合盐;禽类细菌性疾病;杀灭效果

中图分类号:R187.1;S851.3

文献标识码:A

文章编号:1001-7658(2019)03-0167-03

DOI:10.11726/j.issn.1001-7658.2019.03.003

Evaluation on the inactivation efficacy of oxone monopersulfate compound on poultry pathogenic microorganism

WANG Juan, YUAN Jian-feng, WANG Gui-ping

(Guangdong Haid Institute of Animal Husbandry & Veterinary, Guangzhou Guangdong 511400, China)

Abstract **Objective** To observe the inactivation efficacy of the oxone monopersulfate compound in poultry pathogenic microorganism, and to provide the basis for poultry enclosure disinfection. **Methods** Suspension qualitative and quantitative methods were used to evaluate the disinfection efficacy of oxone monopersulfate compound on *Escherichia coli*, *Riemerella anatipestifer*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella*, and the germicidal efficacy on *Escherichia coli* and *Salmonella* at three different temperatures 10 ℃, 20 ℃, 30 ℃ were compared. **Results** With the evaluation criterion of the bactericidal logarithm values >5.00, the minimum bactericidal concentrations of oxone monopersulfate compound (based on the activating oxide content) for *Escherichia coli*, *Riemerella anatipestifer*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* were 230 mg/L, 14.375 mg/L, 57.5 mg/L and 115 mg/L in 5 minutes, respectively. And in the range of temperature test, the bactericidal effect of oxone monopersulfate compound on *Escherichia coli* and *Salmonella* was significantly increased when the test temperature raised from 10 ℃ to 30 ℃. **Conclusion** It's proved that oxone monopersulfate compound possessed excellent laboratory efficacy in killing poultry pathogenic microorganism, and increasing the temperature is helpful to improve its inactivation efficacy.

Key words oxone monopersulfate compound; poultry bacterial disease; inactivation efficacy

随着禽类养殖向规模化、集约化方向发展,由细菌病原微生物和病毒引起的各类感染性疾病严重影响着养禽业发展。许多禽类细菌性疾病一旦发生很难控制,短时间内造成很大经济损失。目前临床上

对于禽类细菌性疾病多采取抗菌药物治疗的措施,虽然在一定程度上可杀灭病原菌,但是长期用药造成的耐药性问题也日趋严峻。积极做好饲养环境卫生对于综合预防和控制禽类传染病至关重要^[1]。使用消毒剂对畜禽及其周围环境进行消毒是最有效的方法之一。本研究通过采用一种复方消毒剂过硫酸钾复合物粉剂对禽源大肠杆菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌和鸭疫里默杆菌的实验室杀灭效果进行评估,比较不同温度下消毒剂的杀灭效果,为对禽病细

〔基金项目〕 广东省科技计划项目(2014A020208052);广州市科技计划项目(201704020083)
〔作者简介〕 王娟(1991-),女,湖南岳阳人,硕士,从事预防兽医研究工作。
〔通讯作者〕 袁建丰,Email: yuanjif@haid.com.cn

菌病原微生物消毒剂的现场使用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用过硫酸氢钾复合盐为国内某企业产品,性状为白色粉剂,活性氧含量 4.6%。试验细菌为大肠杆菌(EC 1501)、沙门菌(SM 140712)、金黄色葡萄球菌(SA 1305)和鸭疫里默杆菌(RA f 63),均由本实验室分离并保存。普通营养琼脂、营养肉汤、胰大豆蛋白胨琼脂及其肉汤,硫代硫酸钠和小牛血清白蛋白等均为国内市售产品。

1.2 方法

1.2.1 试验菌悬液和消毒剂溶液制备 参照 2002 年版《消毒技术规范》进行细菌悬液制备^[2]。称取 2 g 过硫酸氢钾复合盐粉末,溶于 100 ml 生理盐水中,使用 0.02 μm 滤器过滤,制备活性氧浓度为 920 mg/L 的消毒液受试液。

1.2.2 中和剂鉴定试验 以大肠杆菌(EC 1501)为试验指示菌,参照 2002 年版《消毒技术规范》^[2]消毒剂杀微生物试验中和剂鉴定试验规定进行操作及结果判定。

1.2.3 室温下消毒剂对细菌定性杀菌试验 对受试菌悬液进行细菌计数,用 0.03 mol/L 的 PBS 稀释,使用 30 g/L 小牛血清白蛋白溶液进行对倍稀释,使含菌量为 5 × 10⁶ cfu/ml 左右。取 10 支试管编号后分别加入 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液 2.5 ml。在第 1 支管内加入 2.5 ml 消毒剂,混匀后过硫酸氢钾浓度为 460 mg/L。从第 1 管中取 2.5 ml 溶液加入第 2 管,混匀后继续 2 倍稀释至第 9 管,第 9 管混匀后弃去 2.5 ml。阳性对照设置为第 10 管。以 30 min/L 的速度加受试菌液 2.5 ml 于 10 个管内。于反应时间 5、10、15、30 和 60 min 时,分别从每管中取出 0.5 ml 反应液,加入至含 0.5% 硫代硫酸钠中和剂 4.5 ml 肉汤培养基中混合均匀,中和反应 10 min 后,取 0.2 ml 涂布琼脂平板,置 37 ℃ 培养 48 h,设置同批琼脂平板为阴性对照。结果判定:以无菌生长平板所含消毒液的最低浓度为最低杀菌有效浓度;以无菌生长平板的最短消毒时间为该浓度杀菌最快有效时间;阴性对照平板应无菌生长。

1.2.4 室温下消毒剂对细菌定量杀菌试验 对受试菌悬液细菌计数,用 0.03 mol/L 的 PBS 稀释,使用 30 g/L 小牛血清白蛋白溶液进行对倍稀释,使含菌量 5 × 10⁶ ~ 5 × 10⁷ cfu/ml。取无菌试管,先加入 0.5 ml 菌液,然后加入测试浓度消毒液 4.5 ml,迅速混匀并即刻计时。作用至 5、10 和 30 min 时,分别

取 1 ml 反应液加入 9 ml 浓度为 1% 的中和剂中,充分混匀,室温下作用 10 min 后移取 0.1 ml 活菌培养计数,试验重复 3 次。当菌落数较多时活菌计数 10 倍系列稀释。以 0.03 mol/L PBS 代替消毒液,进行阳性对照试验。设置同批琼脂平板为阴性对照。37 ℃ 培养 48 h 后观察结果。计算每组活菌平均浓度并换算为对数值,公式为:杀灭对数值 = 对照组平均活菌浓度的对数值 - 试验组活菌浓度对数值。阴性对照平板应无菌生长。

1.2.5 温度对过硫酸氢钾复合盐杀菌作用影响 按照悬液定量杀菌方法,设定反应温度分别为 (10 ± 1) ℃、(20 ± 1) ℃ 和 (30 ± 1) ℃,与过硫酸氢钾反应时间分别为 5、15 和 30 min。试验温度高于室温时用恒温水浴箱调节,低于室温时用冷水浴装置进行调节。分别在 3 种不同温度条件下,用浓度为 28.75 mg/L 过硫酸氢钾复合盐对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作用不同时间,悬液定量杀菌试验测定,各组试验至少重复 3 次,比较杀菌对数值。

2 结果

2.1 中和剂鉴定试验结果

在试验温度为 (20 ± 1) ℃,作用时间为 5 min 条件下,第 1 组无细菌菌落生长,第 2 组菌落数 > 5,但较第 3、4、5 组少,第 3、4、5 组组间误差均 < 15%,第 6 组无菌生长,表明 1% 硫代硫酸钠可作为中和剂,能有效中和过硫酸氢钾复合盐残留,且中和剂与中和产物对细菌和培养基无影响,详见表 1。

表 1 中和剂载体定量鉴定试验细菌菌落数($\bar{x} \pm s$)		
序号	组别	大肠杆菌菌落数 (cfu/ml)
1	消毒剂 + 菌液	0 ± 0
2	(消毒剂 + 菌液) + 中和剂	20 ± 1.64
3	中和剂 + 菌液	182.5 ± 5.25 × 10 ⁴
4	(消毒剂 + 中和剂) + 菌液	203.7 ± 14.84 × 10 ⁴
5	PBS + 菌液	211.3 ± 7.8410 ⁴
6	PBS + 中和剂 + 培养基	0 ± 0

2.2 悬液定性杀菌试验结果

在 (20 ± 1) ℃ 条件下检测结果显示,过硫酸氢钾复合盐与菌种作用时间影响杀灭效果,作用时间越短所需杀灭浓度越高。5 min 杀灭大肠杆菌所需浓度为 230 mg/L;60 min 则需浓度为 28.75 mg/L。而在作用时间相同情况下,不同菌种对过硫酸氢钾的抵抗力存在差异,5 min 内过硫酸氢钾杀灭大肠杆菌、鸭疫里默杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门菌所需浓度分别为 230、14.38、115.00 和 460.00 mg/L,结果见表 2。

表 2 室温条件下悬液定性杀灭试验结果					
细菌名称	不同作用时间(min)过硫酸氢钾复合盐的 杀灭浓度(mg/L)				
	5	10	15	30	60
大肠杆菌	230.00	230.00	57.50	28.75	28.75
鸭疫里默杆菌	14.38	14.38	7.19	7.19	7.19
金黄色葡萄球菌	115.00	57.50	57.50	57.50	28.75
沙门菌	460.00	460.00	460.00	460.00	230.00

2.3 悬液定量杀菌试验结果

以杀灭细菌对数值 >5.00 为评价标准,过硫酸氢钾复合盐对大肠杆菌、鸭疫里默杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门菌作用 5 min 的杀灭浓度分别为 230、14.38、57.5 mg/L 和 115 mg/L,结果见表 3。

表 3 室温下过硫酸氢钾复合盐对细菌杀灭试验结果				
细菌名称	消毒剂浓度 (mg/L)	不同作用时间(min)杀灭对数值		
		5	10	30
大肠杆菌	230.00	7.95	7.95	7.95
	115.00	4.25	7.95	7.95
	57.50	2.87	3.83	7.95
鸭疫里默杆菌	28.75	7.90	7.90	7.90
	14.38	7.90	7.90	7.90
	7.19	5.85	7.90	7.90
金黄色葡萄球菌	115.00	6.69	6.69	6.69
	57.50	6.69	6.69	6.69
	28.75	4.36	6.69	6.69
沙门菌	230.00	7.60	7.60	7.60
	115.00	7.60	7.60	7.60
	57.50	2.90	3.87	4.70

注:大肠杆菌、鸭疫里默杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门菌阳性回收菌对数值分别为 7.95、7.90、6.69 和 7.60。

2.4 试验温度对过硫酸氢钾复合盐杀菌效果的影响

试验温度影响过硫酸氢钾复合盐杀菌效果,试验温度由 10℃ 提高至 30℃,过硫酸氢钾复合盐对大肠杆菌和沙门菌的的杀菌效果增强;试验温度由 10℃ 上升至 30℃,过硫酸氢钾复合盐对大肠杆菌杀灭作用 10 min 内,其效果增强 2.5~4.8 倍;作用 30 min 内,对沙门菌的杀灭效果增强 1.5~2.1 倍,结果见表 4。

表 4 不同温度下过硫酸氢钾复合盐对细菌杀灭试验结果				
细菌名称	温度(℃)	不同作用时间(min)平均杀菌对数值		
		5	10	30
大肠杆菌	10	1.65	3.13	7.95
	20	2.87	3.83	7.95
	30	7.95	7.95	7.95
沙门菌	10	2.82	3.58	4.24
	20	2.90	3.87	4.70
	30	6.00	6.23	6.34

注:大肠杆菌和沙门菌阳性回收菌对数值分别为 7.95 和 7.60。

3 讨论

过硫酸氢钾复合粉是一种平衡的过氧化物,以过硫酸氢钾复合盐为主要成分,主要包括硫酸氢钾、硫酸氢二钾和硫酸钾等,并辅以氯化钠和表面活性剂等,可通过破坏细菌细胞壁蛋白及其通透性发挥杀菌作用。近年来因其具有低毒、广谱、高效和使用方便等优点^[3],被作为兽用复方消毒剂广泛应用。

本研究结果显示,相同作用时间和作用温度下,过硫酸氢钾复合盐杀灭不同种类的细菌所需浓度不同,表现为对大肠杆菌和沙门菌的杀灭浓度较高,而对鸭疫里默杆菌杀灭浓度较低。分析菌株对该消毒剂抵抗力不同的原因可能与细胞壁结构及菌株本身活性差异有关。此外,当作用温度由 10℃ 上升至 30℃ 时,过硫酸氢钾复合盐对大肠杆菌和沙门菌杀灭对数值随着温度升高而明显增高,说明升高温度有利于增强杀菌效果,这与谈智和付维星等^[4,5]的研究结论相似。原因可能为温度升高消毒剂渗透力增强,导致杀菌能力增加。近年来单过硫酸氢钾或其复合盐的消毒效果及其影响因素已有相关报道^[6-8],但缺乏对禽类相关病原杀菌效果的系统研究。本研究对一种复方消毒剂过硫酸钾复合物粉剂对禽类常见细菌杀灭效果进行评估,比较不同温度下的杀灭效果,并结合过硫酸氢钾复合盐对鸡新城疫病毒的杀灭效果研究结果^[9],说明该类消毒剂对禽类常见病原微生物杀灭作用较好,对禽类圈舍消毒剂的选择及现场使用能够提供有效参考依据。

参 考 文 献

[1] 李兴无,肖立峰. 禽类细菌性疾病的防治措施[J]. 中国畜牧兽医文摘,2017,33(6):143.

[2] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 2002.

[3] Amass SF, Schneider JL, Gaul AM. Evaluation of current and novel protocols for disinfection of airplane passenger footwear under simulated conditions[J]. Prev Vet Med, 2005, 71(1-2):127-134.

[4] 谈智,孙巍,唐晨晨,等. 单过硫酸氢钾复合盐杀菌效果与影响因素研究[J]. 中国消毒学杂志,2017,34(1):5-8.

[5] 付维星. 过硫酸氢钾复合粉消毒剂的研究[D]. 北京:中国农业科学院,2011.

[6] 阳艳林,隆雪明. 过硫酸氢钾复合粉消毒作用试验研究[J]. 中国兽药杂志,2008,42(3):34-36.

[7] 张福娥,王晓瑞,宋晓红,等. 一种过硫酸氢钾复合盐消毒相关性能观察[J]. 中国消毒学杂志,2017,34(1):34-35,38.

[8] 武镪,乔玫,李虹. 一种单过硫酸氢钾复合盐消毒剂的相关性能观察[J]. 中国消毒学杂志,2018,35(12):946-948.

[9] 王娟,卞国志,袁建丰,等. 过硫酸氢钾复合盐对鸡新城疫病毒杀灭效果观察[J]. 中国消毒学杂志,2018,35(8):563-565.