

鸡场土壤中大肠杆菌的检测与化学消毒剂筛选

赵月¹, 毕丁仁^{1,2*}, 李自力^{1,2*}, 王振豹¹, 崔惠娟¹, 高小聪¹,
于洋¹, 周祖涛², 刘梅^{1,2}, 金卉^{1,2}, 王香萍¹

(1. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070)

[收稿日期] 2012-10-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 06-0031-05 [中图分类号] S859.79

[摘要] 应用平板计数法和大肠菌群最大或然数(MPN)法对44份养鸡场土壤样品污染情况进行测定,结果表明春秋季节土壤污染较夏冬季严重;以从养鸡场土壤样品中分离鉴定的大肠杆菌作为指示菌,对戊二醛和二氧化氯的杀菌效力进行了测定,定量悬浮试验结果表明0.01%戊二醛作用30 min、0.02%戊二醛作用5 min、25 mg/L二氧化氯作用10 min,对大肠杆菌的杀灭率均达到100%。以土壤为载体的消毒试验结果表明0.01%戊二醛作用30 min、0.02%戊二醛作用10 min和300 mg/L二氧化氯作用30 min、400 mg/L二氧化氯作用10 min,对大肠杆菌的杀灭率均达到100%,两种消毒剂均具有良好的杀灭效果。

[关键词] 大肠杆菌;土壤污染;化学消毒剂;杀灭效果

The Detection of *Escherichia coli* in the Soil of Chicken Farm and the Selection of Chemical Disinfectant

ZHAO Yue¹, BI Ding-ren^{1,2*}, LI Zi-li^{1,2*}, WANG Zhen-bao¹, CUI Hui-juan¹,
GAO Xiao-cong¹, YU Yang¹, ZHOU Zu-tao², LIU Mei^{1,2}, JIN Hui^{1,2}, WANG Xiang-ping¹

(1. College of Veterinary Medicine, Wuhan 430070, China; 2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Forty-four soil samples collected from the chicken farms were detected, and the contamination circumstances were evaluated with colony counting method and MPN method. The results suggested that the amount of total bacteria was higher than that of coliform group, which was higher than *Escherichia coli*. The chicken farm soil was highly contaminated in spring and autumn while less contaminated in summer and winter. A strain of *E. coli* was isolated and identified from the soil sample collected from a chicken farm which was used in the following study on efficacy of different chemical disinfectants. The results of quantitative suspension test of glutaraldehyde as a disinfectant showed that with 0.01% concentration for 30 min or with 0.02% concentration for 5 min to *E. coli* had a killing rate at 100%. The results of quantitative suspension test of chlorine dioxide as a disinfectant showed that the activity of *E. coli* was full eliminated by 25 mg/L chlorine dioxide function for 10 min. The results of glutaraldehyde soil carrier disinfection test demonstrated that with 0.01% concentration 30 min or with 0.02% concentration 10 min for *E. coli* had a 100% killing rate. The results of chlorine dioxide

基金项目: 国家863计划(2009A06Z302)

作者简介: 赵月, 博士研究生, 从事兽医微生物与免疫学方面研究。

通讯作者: 毕丁仁, E-mail: bidingren@mail.hzau.edu.cn; 李自力, E-mail: lizili@mail.hzau.edu.cn

soil carrier disinfection test demonstrated that with 300 mg/L concentration for 30 min or with 400 mg/L concentration for 10 min for *E. coli* could achieve a 100% killing rate. Both of the two chemical disinfectants revealed a favorable bactericidal killing effect.

Key words: *Escherichia coli*; soil contamination; chemical disinfectant; sterilization efficacy

近年来,畜禽舍气源性传染病的爆发流行以及畜禽粪便随意排泄导致的土壤污染问题日益严重,不仅给畜牧业造成严重经济损失,而且威胁公民的健康和公共安全^[1-3]。养殖场周围的土壤环境污染问题越来越受到人们的关注,土壤一旦被污染,其组成和理化性质等均会发生变化。不仅破坏其自身的正常功能,而且可通过土壤中病原菌的进一步扩散等过程对地下水造成污染以致对人体健康构成危害^[4-6]。因此,养殖场污染土壤的治理与修复就显得至关重要,土壤治理仍成为当前面临的一大难题^[9-10]。虽然国内外已有较多报道从不同方面对土壤中病原菌的控制进行了相关研究,且用于病原微生物的化学消毒剂种类也较多^[7-8],但针对被污染土壤的可大规模推广应用且对环境影响较小的消毒剂相关研究鲜有报道,本研究通过对湖北省部分地区鸡场内的污染土壤进行调查分析,了解土壤受污染情况,同时应用戊二醛和二氧化氯消毒剂对鸡场土壤所分离的大肠杆菌进行消毒试验,为今后用于土壤治理的化学消毒剂的选择使用提供依据。

1 材料

1.1 供试土样 于2009~2010年采集于湖北省汉川、钟祥、江夏等地养鸡场鸡舍附近土壤。

1.2 主要试剂 卵磷脂、25%戊二醛等,国药集团化学试剂有限公司;营养琼脂、麦康凯琼脂、伊红美蓝琼脂和各种微量生化反应管,杭州微生物试剂有限公司;TSB、TSA培养基,BD公司。胰蛋白胨,酵母浸出物,OXOID公司;琼脂粉,BIOSHARP公司。月桂基硫酸盐胰蛋白培养基和煌绿乳糖胆盐培养基,上海盛思生化科技有限公司;二氧化氯,湖南坤源股份有限公司。

2 方法

2.1 土壤中污染指标的检测方法

2.1.1 土壤中异养菌含量检测 参照参考文献^[11]方法,通过将所采集土壤样品制成不同稀释度的稀释液,涂布TSA平板,37℃培养18~24h后统计菌落数,根据稀释度即可计算出土壤样品中含菌数。

2.1.2 土壤中大肠菌群含量检测 制备一系列稀释度的土壤菌悬液,方法同上。参照参考文献^[17]通过无菌吸取1 mL土壤菌悬液先接种月桂基硫酸钠胰蛋白胨肉汤(LST),再取一菌环接种至黄绿乳糖胆盐肉汤(BGLB),最后将阳性管菌液接种伊红美蓝培养基进行细菌鉴定。将经过LST-BGLB两步发酵之后,并且分离培养有大肠杆菌的阳性管数记录,对照MPN三次重复表查看结果。

2.1.3 土壤中大肠杆菌含量检测 取不同稀释度的土壤悬液100 μL涂布麦康凯平板,37℃培养18~24h后统计菌落数,根据稀释度可大致估算土壤中大肠杆菌含量。

2.1.4 评价标准 判定土壤污染程度的评价标准有两种,即根据土壤细菌总数或大肠菌值进行评价^[12]。大肠菌值是指能检出大肠杆菌的最小土壤量(单位:g)。比较清洁的土壤,每克细菌总数在一万左右;严重污染的土壤,细菌总数可达数百万。清洁土壤中大肠菌值>1.0;轻度污染土壤大肠菌值1.0~0.01;中度污染土壤大肠菌值0.01~0.001;严重污染土壤大肠菌值<0.001。

2.2 鸡场土壤大肠杆菌的分离鉴定

2.2.1 细菌分离培养及纯化 无菌操作取100 μL土壤菌悬液涂布麦康凯琼脂平板上,37℃培养18~24h。挑取阳性菌落接种于伊红美蓝琼脂平板上,37℃培养18~24h。阳性菌落接种于普通琼脂平板上分区划线进行扩大纯培养,37℃培养18~24h后,对菌落形态进行观察,挑取单菌落进行革兰氏染色鉴定。

2.2.2 生化试验 按常规方法进行单糖发酵、吡啶、MR和VP试验等生化试验。

2.2.3 致病性试验 参照参考文献^[13]方法将所分离菌株的24h肉汤培养物用麦氏比浊管调整菌浓度为 1.0×10^8 CFU/mL,经腹腔注射接种25~30 g小鼠,每只0.2 mL,接种3只。接种后开始记录发病与死亡情况。对死亡小鼠进行剖检,从心脏和肝脏进行细菌复分离与鉴定。

2.3 消毒剂对大肠杆菌的杀灭效果试验

2.3.1 分离株菌悬液的制备 试验使用菌种第3~16代的营养琼脂斜面新鲜培养物,吸取5.0 mL灭菌1×PBS加入斜面试管内,反复吹洗以便洗下菌苔。将细菌悬液转移至另一无菌EP管中,漩涡混合30 s至1 min,即为所使用细菌悬液。

2.3.2 中和剂鉴定试验 按消毒技术规范^[14]规定的中和剂鉴定试验程序设计4组试验,以大肠杆菌汉川鸡场分离株为试验菌,分别对两种消毒剂最高使用浓度进行中和剂鉴定,符合判断标准者作为相应中和剂。判断标准为:第1、2和3组有相似量试验菌生长,平皿培养生长菌量在30 CFU/mL~300 CFU/mL之间,且组间菌落数误差率不超过15%;第4组无菌生长。符合上述标准即为所用中和剂及其浓度为合格。

2.3.3 定量悬浮消毒试验 参照文献方法^[14]分组。(1)试验组:临用前取0.5 mL试验菌悬液(5×10^6 CFU/mL~ 5×10^7 CFU/mL)于试管中,加入0.5 mL 30 g/L的BSA。置于20℃±1℃水浴5 min后,加入4.0 mL待测浓度的戊二醛(二氧化氯),混匀后作用至预定时间,取0.5 mL试验菌与消毒剂混合液加至4.5 mL相应中和剂中,混匀后水浴作用10 min。分别取0.1 mL涂布三个麦康凯琼脂平板。37℃恒温培养16~24 h后观察并计数并计算杀灭对数值。(2)阳性对照组:与试验组相似,以标准硬水代替戊二醛(二氧化氯)消毒剂进行试验。(3)阴性对照组:取当次试验所用中和剂、1×PBS、标准硬水各1.0 mL于同一EP管内,分别取0.1 mL涂布三个麦康凯琼脂平板,37℃培养16~24 h后观察。

2.3.4 以土壤为载体的消毒试验 参照参考文献^[8]方法分组。(1)试验组:取1 mL菌液(1×10^6 CFU/mL⁻¹× 10^8 CFU/mL)加入放有4 g土壤的灭菌平皿内混匀。加入5 mL已知浓度的戊二醛(二氧化氯)作用至预定时间,取0.5 g试验菌、消毒剂及土壤混合液加至4.5 mL相应中和剂中,混匀后作用10 min。取0.1 mL涂布三个麦康凯琼脂平板,于37℃恒温培养16~24 h后观察计数并计算杀灭对数值。(2)阳性对照组:以标准硬水代替消毒剂进行试验。(3)阴性对照组:参见定量悬浮试验2.3.3。

2.3.5 数据处理 计算各组的活菌浓度N(CFU/mL),并换算为对数值,按下式计算杀灭对数值:杀灭对

数值(KL)=对照组平均活菌的对数值(lgN0)/试验组活菌浓度对数值(lgNt)。

3 结果与分析

3.1 湖北省养鸡场污染情况调查结果 通过对2009~2010年在湖北省汉川、江夏等地采集的养鸡场土壤菌含量进行测定并对其污染情况进行评价。所测定鸡场土壤都有不同程度的污染,且春秋两季土壤污染较夏冬两季严重(表1、表2)。

表1 土壤污染情况(大肠菌值)						
采样季节	样本数	清洁	轻度污染	中度污染	严重污染	污染样品数
春	10	2	1	3	4	8
夏	8	4	1	1	2	4
秋	16	1	3	2	10	15
冬	10	2	2	2	4	8
总计	44	9	7	8	20	35

表2 土壤污染情况(土壤总菌含量)					
采样季节	样本数	比较清洁	中度污染	严重污染	污染样品数
春	10	1	2	7	9
夏	8	2	3	3	6
秋	16	0	5	11	16
冬	10	1	3	6	9
总计	44	3	9	32	41

3.2 分离菌株的鉴定

3.2.1 培养特性及形态特征 分离菌株在各培养基上呈现典型大肠杆菌菌落特征:在营养琼脂上形成圆形隆起、边缘整齐、表面光滑湿润、半透明且近似灰白色的菌落。在麦康凯琼脂上形成圆形隆起、边缘整齐、表面光滑湿润且直径约2.0 mm红色菌落;在伊红美蓝琼脂上形成圆形隆起、表面光滑、中央呈紫黑色且对光观察具有金属光泽、直径约2~3 mm的菌落。分离菌为革兰氏阴性、无芽胞短杆菌,多单个散在或成对分布,符合大肠杆菌的形态特征。

3.2.2 生化鉴定结果 结果显示该分离菌能发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇和山梨醇,不发酵蔗糖,不液化明胶,吡啶试验和MR试验均为阳性;VP试验阴性,初步判定为大肠杆菌。

3.2.3 致病性试验结果 接种分离菌株的三只小鼠在接种后48~72 h全部死亡,剖解未见明显病理变化。从死亡小鼠的心脏和肝脏均可分离到接种菌。复分离培养与生化鉴定结果均与接种菌一致。

3.3 消毒剂对大肠杆菌分离株杀灭效力测定

3.3.1 中和剂试验结果 结果表明采用中和剂

10 g/L吐温-80 配合 10 g/L 甘氨酸与 5 g/L 卵磷脂的 PBS 溶液,能够中和 0.02% 戊二醛对大肠杆菌的杀灭作用;采用中和剂 5 g/L 硫代硫酸钠与 8 g/L吐温-80 的 PBS 溶液,能够中和 400 mg/L 二氧化氯对大肠杆菌的杀灭作用,且中和剂与中和产物对指示菌生长均无明显影响,符合中和剂鉴定试验要求各项指标。戊二醛和二氧化氯中和剂鉴定结果见表 3 和表 4。

表 3 戊二醛杀灭大肠杆菌中和剂鉴定结果					
组别	每次试验生长菌落数/(CFU·mL ⁻¹)			4	组间误差率/%
	1	2	3		
1	3.37×10 ⁴	2.84×10 ⁴	1.43×10 ⁴	0	6.82
2	2.77×10 ⁴	3.29×10 ⁴	1.62×10 ⁴	0	7.61
3	3.12×10 ⁴	2.72×10 ⁴	1.53×10 ⁴	0	3.91

注:试验温度为 20℃±1℃,作用时间为 10 min,阴性对照组无菌生长。

表 5 戊二醛对大肠杆菌的杀灭效果(存活对数值)							
戊二醛浓度/%	作用不同时间的活菌对数值/min						
	1	3	5	10	15	30	60
0.0025	6.40	6.33	6.16	6.12	6.03	5.32	4.29
0.005	6.30	6.14	5.87	5.62	4.33	2.53	—
0.01	6.29	6.13	5.71	4.14	3.20	—	—
0.02	6.21	4.05	—	—	—	—	—

注:以上结果为 3 次试验的平均值。试验温度 20℃±1℃。阳性对照组平均菌落。阳性对照组平均菌落数的对数值为 6.40,范围:5.62~6.42。阴性对照组无菌生长。

表 6 二氧化氯对大肠杆菌的杀灭效果(存活对数值)					
二氧化氯浓度/(mg·L ⁻¹)	作用不同时间的活菌对数值/min				
	2	5	10	30	60
100	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-
25	5.01	4.19	-	-	-
10	6.70	6.28	4.36	4.19	3.88

注:以上结果为 3 次试验的平均值。试验温度 20℃±1℃。阳性对照组平均菌落数的对数值为 8.39,范围:7.91~8.39。阴性对照组无菌生长。

3.3.3 以土壤为载体的消毒试验结果 戊二醛和二氧化氯土壤载体消毒试验结果分别见表 7 和表 8。从表 7 可以看出,0.02% 戊二醛作用 10 min 或 0.01% 戊二醛作用 30 min 对大肠杆菌的杀灭率均可达到 100%,而 0.0025% 戊二醛作用 60 min 也未能完全杀灭大肠杆菌。从表 8 可以看出,400 mg/L 二氧化氯作用 10 min 或 300 mg/L 二氧化氯作用 30 min 对大肠杆菌的杀灭率均可达到 100%;而 200 mg/L 二氧化氯即使作用 60 min 也未能完全杀灭大肠杆菌。

表 4 二氧化氯杀灭大肠杆菌中和剂鉴定结果					
组别	每次试验生长菌落数/(CFU·mL ⁻¹)			4	组间误差率/%
	1	2	3		
1	1.55×10 ⁴	1.45×10 ⁴	1.48×10 ⁴	0	2.48
2	1.25×10 ⁴	1.11×10 ⁴	1.43×10 ⁴	0	8.67
3	1.24×10 ⁴	1.44×10 ⁴	1.14×10 ⁴	0	8.60

注:试验温度为 20℃±1℃,作用时间为 10 min,阴性对照组无菌生长。

3.3.2 定量悬浮消毒试验结果 戊二醛和二氧化氯定量悬浮消毒试验结果分别见表 5 和表 6。从表 5 可以看出,0.02% 戊二醛作用 5 min 或 0.01% 戊二醛作用 30 min 对大肠杆菌的杀灭率均可达到 100%,而 0.05% 戊二醛作用 60 min 才能完全杀灭大肠杆菌。从表 6 可以看出,50 mg/L 与 100 mg/L 二氧化氯作用 2 min 对大肠杆菌的杀灭率均可达到 100%,而 25 mg/L 二氧化氯作用 10 min 才能完全杀灭大肠杆菌。

表 7 戊二醛对大肠杆菌的杀灭效果(存活对数值)					
戊二醛浓度/%	作用不同时间的活菌对数值/min				
	2	5	10	30	60
0.0025	6.02	5.96	5.88	4.35	3.26
0.005	5.97	5.80	5.76	3.87	-
0.01	5.78	5.62	4.28	-	-
0.02	5.06	2.82	-	-	-

注:以上结果为 3 次试验的平均值。试验温度 20℃±1℃。阳性对照组平均菌落数的对数值为 6.13,范围:5.76~6.16。阴性对照组无菌生长。

表 8 二氧化氯对大肠杆菌的杀灭效果(存活对数值)					
二氧化氯浓度/(mg·L ⁻¹)	作用不同时间的活菌对数值/min				
	2	5	10	30	60
400	5.62	4.30	-	-	-
300	5.37	4.89	4.17	-	-
200	5.22	5.02	4.52	3.70	3.00
100	5.81	5.49	5.33	5.06	4.84

注:以上结果为 3 次试验的平均值。试验温度 20℃±1℃。阳性对照组平均菌落数的对数值为 7.66,范围:7.24~7.69。阴性对照组无菌生长。

4 讨论

无论以总菌含量还是以大肠菌值为标准,土壤污染程度均表现出春秋两季高于夏冬两季。春秋两季土壤污染严重可能和季节气候相关,一般春秋两季适宜的气候条件适宜大多数细菌的生长,而夏季高温、冬季寒冷一般不利于细菌的生长繁殖,这可能是造成土壤中细菌乃至病原菌数量较多的原因之一。同时,养殖场畜禽在春秋两季发病情况也会有所增加,可能通过气溶胶等进行病原菌的传播,而造成土壤中病原菌含量的相对增加。因此,在适宜病原菌生长的春秋季节尤其要加强鸡舍乃至附近土壤的消毒工作,防止病原菌进一步扩散。

化学消毒剂因其广谱消毒性在畜牧生产中对于控制病原微生物的传播、预防和治理流行疾病具有非常积极意义^[15]。王静等通过对规模化鸡场消毒前后结果表明,消毒后鸡舍内空气中细菌含量明显降低,减少了疫病发生的可能^[16]。但目前有关对土壤病原菌进行消毒杀灭的研究还很少^[10]。王莉等研究了四种消毒剂对土壤中污染的霍乱弧菌的杀灭效果,500 mg/L(有效氯)作用3 min即可杀灭田土中的霍乱弧菌^[8]。廖骏等研究也表明,几种含氯消毒剂对土壤中埃尔托弧菌具有良好的杀灭效果。这些都与本研究二氧化氯具有较强的杀灭效果相一致^[18]。研究应用戊二醛和二氧化氯的定量悬浮试验和以土壤为载体的消毒试验都表明这两种消毒剂均具有良好的消毒效果,但土壤的存在明显降低了消毒剂的杀菌效力。此次试验由于土壤载体的量小,故其消毒效果尚需进一步通过田间试验来加以验证,但仍具有一定的指导意义,建议针对鸡场污染土壤中的大肠杆菌可选择0.02%戊二醛或400 mg/L二氧化氯进行消毒处理。在养殖场实际应用过程中,还应根据具体情况适当调整所用消毒剂的种类和浓度以达到最佳杀菌效果,从而保证土壤的安全洁净,有效控制疾病的流行、蔓延,保障人类的健康。

参考文献:

- [1] 江传杰,王岩,张玉霞. 畜禽养殖业环境污染问题研究[J]. 河南畜牧兽医,2005,26(1):28-31.
- [2] 金淮,常志州,朱述钧. 畜禽粪便中人畜共患病菌传播的公众健康风险[J]. 江苏农业科学,2005,3:103-105.
- [3] 张鹤平. 养殖场及其周围环境空气中细菌播散研究[D]. 北京:中国农业大学图书馆,2005.
- [4] Wang G,Zhao T,Doyle M P. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces[J]. Appl Environ Microbiol,1996,62(7):2567-2570.
- [5] Larney F J,Yanke L J,Miller J J,et al. Fate of coliform bacteria in composted beef cattle feedlot manure[J]. J Environ Qual,2003,32:1508-1515.
- [6] Gagliardi J V,Karns J S. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices[J]. Appl Environ Microbiol,2000,66:877-883.
- [7] 张冰,秦秀惠,李军,等. 戊二醛和季铵盐复合消毒剂杀菌效果的试验. 动物医学进展,2002,23(3):70-71.
- [8] 王莉,叶庆临,肖霖,等. 几种消毒剂对土壤中污染的霍乱弧菌的消毒效果[J]. 中国卫生检验杂志,2001,11(6):681-682.
- [9] 辛志秀. 减轻畜禽粪便对环境污染的现状及技术探索[J]. 青海畜牧兽医杂志,2004,34(4):35-37.
- [10] 石玉祥,王绥华,钟翠红,等. 鸡舍空气致病菌分离鉴定及其对消毒剂的敏感性观察[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(12):137-139.
- [11] 姚槐应,黄昌勇. 土壤微生物生态学及其实验技术[M]. 第1版. 北京:科学出版社,2006.
- [12] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 第4版. 北京:中国农业出版社,2001.
- [13] 斯木吉德,王纯洁,吴美云. 奶牛新鲜粪便致病性大肠杆菌分离鉴定[J]. 中国兽医杂志,2009,45(8):42-43.
- [14] 卫生部卫生法制与监督司. 《消毒技术规范》2011年版[S].
- [15] 袁拾勋. 实用消毒灭菌技术[M]. 第1版. 北京:化学工业出版社,2002.
- [16] 王静,步长英,孙瑞峰,等. 规模化养鸡场鸡舍空气细菌含量检测[J]. 江西农业大学学报,2007,29(3):429-433.
- [17] 中华人民共和国出口食品中大肠菌群、粪大肠菌群和大肠杆菌检验方法[S].
- [18] 廖骏,叶庆临,王莉,等. 八种消毒剂对埃尔托弧菌杀灭效果及应用研究[J]. 中国消毒学杂志,2003,20(3):175-178.

(责任编辑:陈希)