doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.9.03

戊二醛-癸甲溴铵复合剂对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的杀菌作用研究

侯玉凤¹, 周宇^{1,2}, 王爱玲¹, 吴萌萌¹, 张为民¹, 周宏超¹, 张彦明¹, 郭抗抗^{1*}

(1. 西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100; 2. 延安市动物疫病预防控制中心, 陕西延安 716000)

[收稿日期] 2017-02-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 09-0012-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 为评价戊二醛-癸甲溴铵复合剂在不同条件下对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的杀菌效果, 通过悬液定量杀菌试验探究了戊二醛-癸甲溴铵复合剂在不同环境温度(4℃、25℃、37℃)、不同作用时间(1 min、5 min、10 min)以及存在有机干扰物(3%、25%的牛血清白蛋白)等条件下对猪源大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的杀菌作用。结果显示, 在没有有机物干扰时, 浓度为 167 mg/L 的戊二醛-癸甲溴铵复合剂在 4℃、25℃、37℃ 下均可在 5 min 内完全杀灭 2 种受试菌(10^7 CFU), 说明环境温度对该复合剂的杀菌作用影响不明显。当有机物浓度为 3% 时, 该复合剂在 10 min 内完全杀灭大肠埃希菌的最低浓度为 250 mg/L, 金黄色葡萄球菌为 125 mg/L; 有机物浓度为 25% 时, 作用时间不低于 10 min, 完全杀灭大肠埃希菌的最低浓度为 1000 mg/L, 金黄色葡萄球菌为 1250 mg/L。有机物含量高杀灭相同数量受试菌所需复合剂的量也需要加大、作用时间延长, 说明有机干扰物对复合剂的杀菌作用影响较大。本研究结果提示, 为达到较好的杀菌效果, 养殖场在使用戊二醛-癸甲溴铵复合剂时的有效浓度应不低于 1250 mg/L, 作用时间 10 min 以上时杀菌效果更好。

[关键词] 戊二醛-癸甲溴铵; 大肠埃希菌; 金黄色葡萄球菌; 消毒; 杀菌率

Bactericidal Effect of Glutaraldehyde-Deciquam on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

HOU Yu-feng¹, ZHOU Yu^{1,2}, WANG Ai-ling¹, WU Meng-meng¹, ZHANG Wei-min¹,
ZHOU Hong-chao¹, ZHANG Yan-ming¹, GUO Kang-kang^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China;

2. Yan'an Center for Animal Disease Control and Prevention, Yan'an Shaanxi, 716000, China)

Corresponding author: GUO Kang-kang, E-mail: guokk2007@nwsuaf.edu.cn

Abstract: To evaluate the bactericidal effect of glutaraldehyde-deciquam on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in different environmental conditions, the suspension quantitative germicidal test was carried at different

基金项目: 陕西省重点农业科技示范推广项目(ZDKJ-2014-33)

作者简介: 侯玉凤, 硕士研究生, 从事猪重要疫病防控技术研究; 周宇, 硕士研究生, 兽医师, 从事动物疫病防控技术研究, 为共同第一作者。

通讯作者: 郭抗抗。E-mail: guokk2007@nwsuaf.edu.cn

temperatures (4 °C , 25 °C , 37 °C) , disinfecting time (1 min , 5 min , 10 min) and organic interference (3% , 25% bovine serum albumin) . The results showed that 167 mg/L of this disinfectant disinfect the target bacteria completely within 5 min at 4 °C , 25 °C and 37 °C without bovine serum albumin , indicating the slight influence of environmental temperature on bactericidal effect . The concentration of this disinfectant disinfect *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* completely within 10 minutes were 250 mg/L and 125 mg/L with 3% bovine serum albumin , respectively . However , the concentration of this disinfectant disinfect *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* completely within 10 minutes were 1000 mg/L and 1250 mg/L with 25% bovine serum albumin , respectively . It showed that higher level concentration and longer disinfecting time were needed for glutaraldehyde-deciquam completely disinfect same amounts of tested bacteria in the environmental condition with higher level organic interference . The results in present study suggests that the concentration no less than 1250 mg/L and the disinfecting time no less than 10 minutes for this disinfectant used in swine farm which can be conducted to obtain better bactericidal effect .

Key words: glutaraldehyde-deciquam; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; disinfectant; sterilizing rate

随着养猪业的快速发展,规模化、集约化程度越来越高,在带来良好养殖效益的同时,猪的疫病也不断发生,成为困扰养猪业的一个重大问题。当前危害养猪业的重要病原较多,可分为病毒性病原、细菌性病原、寄生虫性病原等,为了减少和杜绝传染性病原在猪群中的传播,做好生物安全措施至关重要。消毒是猪场生物安全体系的重要环节,做好平时的消毒工作,能够减少病原微生物的数量,减少动物的感染和发病^[1-3]。目前,市场上的消毒剂种类繁多,作用效果也受到各种因素的影响而不尽相同。

戊二醛-癸甲溴铵复合剂是养殖场常用的一种消毒剂,前期对猪场常见病原菌的杀灭效果也受到多种因素影响。调查表明因大肠埃希菌引起的仔猪腹泻和因金黄色葡萄球菌引起猪的急性、亚急性、慢性乳房炎等疾病在采取消毒措施的规模化猪场仍比较常见^[4-5],部分原因是一些规模化养猪场技术人员对消毒剂的使用方法不当造成的。消毒剂的作用受到药物浓度、环境温度、作用时间、微生物的种类和数量、环境中有机干扰物的多少等诸多因素的影响。武守艳^[6]、徐秀荣^[7]等对戊二醛-癸甲溴铵复合剂对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的杀菌作用进行了研究,为其合理使用提供了试验依

据。考虑到猪场由于长期使用消毒剂及使用药物,会造成一些耐药菌株的产生,降低药物的使用效果,本研究以从发病猪上分离的大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌为受试菌,评价戊二醛-癸甲溴铵复合剂在不同条件下对受试菌的作用效果,为猪场更好地使用该消毒剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 猪源大肠埃希菌(*E. coli*)、猪源金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)分离株均由西北农林科技大学动医学院兽医公共卫生学实验室分离、鉴定、保存。该两个分离株均为从患病猪上分离得到,但未进行血清分型。

1.1.2 主要试剂 牛血清白蛋白、吐温-80、甘氨酸、普通营养琼脂均购自杭州天和微生物试剂有限公司;戊二醛、癸甲溴铵等试剂均为国产分析纯试剂。PBS(含 KCl 0.2 g, NaCl 8.0 g, KH₂PO₄ 0.1 g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.036 g, 溶于 1 L 超纯水,调整 pH 至 7.4, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。)。LB 液体培养基(酵母提取物 1.0 g, 胰蛋白胨 2.0 g, NaCl 2.0 g, 溶于 200 mL 超纯水调整 pH 至 7.4, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。4 °C 保存)。LB 固体培养基(在 LB 液体培养基的基础上加 3 g 琼脂粉,其余操

作同 LB 液体培养基)。

1.1.3 戊二醛-癸甲溴铵复合剂及其中和剂的配制
戊二醛-癸甲溴铵复合剂:取 100 g 的戊二醛和 100 g 的癸甲溴铵于 1 L 超纯水中,配制成浓度为 100 g/L 的溶液。中和剂:取 3 mL 的吐温-80、1 g 甘氨酸溶于 97 mL 的 PBS 中,121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。4 °C 备用。

1.2 方法

1.2.1 受试菌株的复苏 将大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌冻干粉接种于 5 mL LB 液体培养基,每个菌种接种 3 管,37 °C 培养 18 h。用接种环挑取菌液在 LB 固体培养基上划线接种,37 °C 培养 24~48 h。挑单个菌落于 50 mL LB 液体培养基中增菌,37 °C 震荡培养 24 h,置 4 °C 备用。

1.2.2 受试菌悬液的制备 按照《消毒技术规范》^[8]和《食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定》^[9]中的有关规定,采用 10 倍稀释法,灭菌用 PBS 溶液将受试菌分别调整为 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ CFU/mL。

1.2.3 戊二醛-癸甲溴铵中和剂的中和作用试验 按照《消毒技术规范》^[8]和韩杰等^[10]方法,用 3% 的吐温-80+1% 的甘氨酸的混合液为戊二醛-癸甲溴铵的中和剂,用受试的大肠埃希菌进行中和试验。将符合消毒剂试验要求的菌悬液与消毒剂按 1 : 9 进行混合、作用。

中和剂试验分以下 6 组。第 1 组:消毒剂+菌悬液;第 2 组:(消毒剂+菌悬液)+中和剂;第 3 组:中和剂+菌悬液,用以验证中和剂是否抑菌;第 4 组:(消毒剂+中和剂)+菌液;第 5 组:稀释液+菌悬液,作为阳性对照;第 6 组:稀释液+中和剂,作为阴性对照。

1.2.4 悬液定量杀菌试验

1.2.4.1 无有机干扰物时戊二醛-癸甲溴铵复合剂的杀菌作用 在不同的消毒剂浓度、环境温度、作用时间条件下,对戊二醛-癸甲溴铵复合剂对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的杀菌效果进行研究。

用 PBS 溶液将戊二醛-癸甲溴铵复合剂 (100 g/L) 分别配制成 500、250、167、125 mg/L 的溶液。分别吸取配制好的复合剂溶液 4.5 mL 于灭菌试管中,再取受试菌液 0.5 mL 于另一无菌的试管中,置于 37 °C、25 °C 和 4 °C 条件下平衡 20 min;然后将平衡好温度的 0.5 mL 菌液加入到 4.5 mL 复合剂中,充分混匀;在平衡好的温度条件下分别作用 1 min、5 min 后,取 0.5 mL 反应液于一新的无菌试管中,加入 4.5 mL 中和剂溶液,混匀后作用 10 min,取 100 μ L 接种于 LB 固体培养基上,涂布均匀后置 37 °C 培养 24 h,进行菌落计数(每个反应管做 2 个板),计算不同条件下的杀菌率。以灭菌 PBS 溶液取代消毒液,其他条件不变作为阳性对照;以灭菌 PBS 溶液取代消毒剂和菌液,其他条件不变作为阴性对照。每个条件下的实验重复三次。

1.2.4.2 存在有机干扰物时戊二醛-癸甲溴铵对受试菌的杀灭作用 在制备好的受试菌悬液中加入牛血清白蛋白,使终浓度分别为 3% 和 25%。选择戊二醛-癸甲溴铵复合剂在无蛋白干扰下的最低有效杀菌剂量,在 25 °C 下进行悬液定量杀菌试验,作用时间分别为 1 min、5 min 和 10 min;如果消毒剂的最低有效杀菌剂量不能进行有效的杀灭时,在此基础上提高复合剂的浓度,再进行悬液定量杀菌试验。通过菌落计数,评价杀菌效果。

2 结果

2.1 戊二醛-癸甲溴铵复合剂的中和剂作用结果 分别用灭菌 PBS 溶液将受试菌浓度调整到 10^7 CFU/mL,满足试验的需要。根据《消毒技术规范》中和剂鉴定合格判断标准。从表 1 可以看出,在戊二醛-癸甲溴铵浓度为 500 mg/L 时,第 1、2 组无菌落生长;第 3、4、5 组之间的菌落误差率 $\leq 15\%$;第 6 组无菌落生长。实验结果说明,3% 吐温-80+1% 的甘氨酸可以作为戊二醛-癸甲溴铵复合剂的中和剂。中和剂、中和剂与消毒剂的反应产物对大肠埃希菌生长均无影响,满足试验要求。

表 1 戊二醛-癸甲溴铵复合剂中和剂的作用结果

Tab 1 The result of neutralizer for glutaraldehyde-deciquam

组别 Groups	1	2	3	4	5	6
细菌数/CFU Number of bacteria	0	1	$(2.8 \pm 0.08) \times 10^7$	$(3.3 \pm 0.16) \times 10^7$	$(3.6 \pm 0.22) \times 10^7$	0

表中结果为三次试验的平均值;25 ℃,作用 5 min

The average of the results for three times trial;at 25 ℃ for 5 min

2.2 无有机干扰物时戊二醛-癸甲溴铵复合剂的杀菌作用 表 2 结果显示,在没有有机物干扰时,戊二醛-癸甲溴铵复合剂浓度 ≥ 167 mg/L 时,在

4 ℃、25 ℃、37 ℃下分别作用 5 min,对两种受试菌的杀菌率均可达到 100%。在试验温度下可见温度对戊二醛-癸甲溴铵的杀菌作用影响不大。

表 2 无有机干扰物时戊二醛-癸甲溴铵复合剂对受试菌的杀灭结果

Tab 2 Bactericidal effect of glutaraldehyde-deciquam on tested bacteria at different temperature without organic interference

浓度/(mg · L ⁻¹) Concentration	温度/℃ Temperature	作用时间/min Disinfecting time	试验菌 Tested bacteria		
			大肠埃希菌 <i>E.coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S.aureus</i>	
125	4	1	87.40	93.42	
		5	99.00	100.00	
	25	1	94.00	95.00	
		5	100.00	100.0	
	37	1	99.00	97.67	
		5	100.0	100.0	
	167	4	1	90.00	97.70
			5	100.0	100.0
25		1	96.70	100.0	
		5	100.0	100.0	
37		1	100.0	100.0	
		5	100.0	100.0	
250		4	1	100.0	100.0
			5	100.0	100.0
	25	1	100.0	100.0	
		5	100.0	100.0	
	37	1	100.0	100.0	
		5	100.0	100.0	
	500	4	1	100.0	100.0
			5	100.0	100.0
25		1	100.0	100.0	
		5	100.0	100.0	
37		1	100.0	100.0	
		5	100.0	100.0	

2.3 存在有机干扰物时戊二醛-癸甲溴铵复合剂对受试菌的杀菌作用 本试验在 25 ℃ 条件下进行。当有机物浓度为 3% 时,戊二醛-癸甲溴铵复合剂在不少于 10 min 的作用时间下,100% 杀灭两种受试菌的最低有效浓度为 250 mg/L。当有机物浓度为 25% 时,戊二醛-癸甲溴铵复合剂在不少于

10 min 的作用时间下,100% 杀灭大肠埃希菌的最低有效浓度为 1000 mg/L,100% 杀灭金黄色葡萄球菌的最低有效浓度为 1250 mg/L。结果见表 3,提示有机干扰物对消毒剂杀菌作用有较大的影响,在猪场环境卫生状况不好时会对消毒剂的杀菌作用有较大的影响。

表 3 存在有机干扰物时戊二醛-癸甲溴铵对受试菌的杀灭作用结果

Tab 3 Bactericidal effect of glutaraldehy-deciquam on tested bacteria in different temperature with organic interference

细菌种类 Bacteria	有机物浓度/% Concentration of organics	消毒剂浓度 (mg · L ⁻¹) Concentration of disinfectant	对照组平均菌落数/CFU The average number of bacteria of positive control	不同时间的平均杀灭率/% Average sterilization rate in different time		
				1min	5min	10min
大肠埃希氏菌 <i>E.coli</i>	0	167		96.70	100.0	100.0
	3	250	1.57×10 ⁷	92.68	98.90	100.0
	25	1000		57.20	98.73	100.0
金黄色葡萄球菌 <i>S.aureus</i>	0	125		95.00	100.0	100.0
	3	250	2.15×10 ⁷	81.30	99.00	100.0
	25	1250		62.80	99.98	100.0

3 讨论

戊二醛是一种速效、广谱的化学杀菌剂,对多种微生物表现出杀灭活性,对繁殖型的细菌、病毒、分枝杆菌、致病性霉菌和细菌芽孢等均有杀灭作用,且对人毒性较低。癸甲溴铵不仅能与阳离子、非离子、两性离子表面活性剂配伍,与乙醇、异丙醇等溶剂复配成复合制剂,耐温、耐光,而且能杀灭细菌繁殖体、真菌、病毒,属高效消毒剂^[11]。癸甲溴铵消毒剂对细菌、真菌、亲脂性病毒有效,但对芽孢作用有限,而戊二醛消毒剂对芽孢杀灭作用显著,二者的结合不仅可以弥补单一消毒剂使用的缺陷,还可以增强杀菌效果和消毒剂稳定性。季铵盐与细菌细胞壁膜上的多磷脂反应,也能使细菌细胞壁上的肽变性,随后戊二醛破坏细菌表面的蛋白受体。戊二醛-癸甲溴铵复合消毒剂在生产中主要应用于猪舍环境、消毒池消毒。本研究发现戊二醛-癸甲溴铵复合消毒剂在相同的浓度和相同的作用

时间对金黄色葡萄球菌的杀菌率高于大肠埃希菌,但具体杀菌机制有待深入研究。

影响消毒剂杀菌效果的主要因素是消毒剂的浓度、作用时间、温度、微生物的种类和数量以及畜舍有机物的干扰。研究发现,温度每升高 10 ℃ 消毒剂的杀灭率提高 2~3 倍,当猪舍内温度 ≤ 16 ℃ 时,消毒剂对病原微生物的杀灭率将会降低;同时,畜舍的粪便的清理程度将会影响消毒剂的杀菌效果^[12-13]。戊二醛-癸甲溴铵复合消毒剂比单体溶液杀菌作用更显著^[7]。合理、有效地使用消毒剂,控制消毒剂污染,对动物疫病防控、环境保护、养殖业健康发展都有着现实重要意义。本研究以猪场常见的病原菌大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌为受试菌,研究了戊二醛-癸甲溴铵复合剂在不同的浓度、温度及不同含量有机物干扰下对受试菌的杀灭作用。结果发现,环境温度对该消毒剂的杀菌作用影响不大,消毒剂浓度、作用时间及有机物的干扰

等因素对其杀菌作用有较大的影响。所以,在猪场使用消毒剂时,为保证有更好的杀灭效果,建议养殖场定期打扫畜舍环境卫生,尽量减少有机物对消毒剂杀菌作用的干扰。在使用戊二醛-癸甲溴铵复合剂消毒时,有效浓度不低于 1250 mg/L,作用时间在 10 min 以上;猪舍粪便、饲料等有机物含量较高时可适当加大消毒剂浓度和延长作用时间。本研究为戊二醛-癸甲溴铵复合剂在猪场的使用提供了参考。

参考文献:

- [1] 郑逢梅,霍金耀,章四新,等.规模化猪场生物安全体系的细节管理[J]. 猪业科学,2016,(9):90-92.
Zheng F M, Huo J Y, Zhang S X, *et al.* Details management of biosecurity system in large-scale pig farm[J]. Swine Industry Science, 2016,(9):90-92.
- [2] 杨雪,陈丹.规模化猪场生物安全体系建设[J].畜牧与饲料科学,2013,34(3):58-59.
Yang X, Chen D. Construction of biosecurity system in large-scale swine farm[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2013,34(3):58-59.
- [3] 乔瑾,赵宝.规模化猪场生物安全控制技术研究[J].畜牧兽医杂志,2011,(4):30.
Qiao J, Zhao B. Study on biosecurity control technology in large-scale swine farm[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2011,(4):30.
- [4] 薛瑞雪,田野,田夫林,等.山东省部分地区仔猪病毒性腹泻流行病学调查[J].中国预防兽医学报,2015,(4):254-257.
Xue R X, Tian Y, Tian F L, *et al.* Epidemiological investigation of piglet diarrhea virus disease in Shandong province[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2015,(4):254-257.
- [5] 王爱玲,蔡俊波,李春燕,等.陕西省某规模化猪场仔猪腹泻病原的分离鉴定[J].中国兽医杂志,2016,(10):40-41.
Wang A L, Cai J B, Li C Y, *et al.* Isolation and identification of diarrhea pathogens in piglets of a large-scale swine farms in Shaanxi province[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2016,(10):40-41.
- [6] 武守艳,韩一超,张玉换,等.癸甲溴铵戊二醛消毒剂杀菌效果的试验[J].中国兽医杂志,2007,(11):70-71.
Wu S Y, Han Y C, Zhang Y H, *et al.* Bactericidal effect of glutaraldehyde-deciquam disinfectant[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2007,(11):70-71.
- [7] 徐秀荣,刘霞,黄迪海,等.戊二醛癸甲溴铵溶液对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌效果研究[J].中国兽药杂志,2015,49(3):30-34.
Xu X R, Liu X, Huang D H, *et al.* Effect test of disinfection compound of glutaraldehyde-deciquam solution on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015,49(3):30-34.
- [8] 卫生部卫生法制与监督司.消毒技术规范[S].北京:中华人民共和国卫生部,2002.
Department of Health Legal and Supervision, Ministry of health. Technical standard for disinfection[S]. Beijing: Ministry of Health of the People's Republic of China,2002.
- [9] 食品安全国家标准 食品微生物学检验菌落总数测定[S].2010.
National Food Safety Standard Food microbiological examination: aerobic plate count[S]. 2010.
- [10] 韩杰,魏秋华.化学消毒剂的中和剂研究现状[J].中国消毒学杂志,2013,(12):1165-1168.
Han J, Wei Q H. Research status of neutralizing agent for chemical disinfectants[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2013,(12):1165-1168.
- [11] 温宪芹,李子尧,赵克义,等.不同试验方法对消毒剂效果的评价[J].中国消毒学杂志,2005,(4):414-415.
Wen X Q, Li Z Y, Zhao K Y, *et al.* Evaluation of disinfectant efficacy by different test methods[J]. Chinese Journal of Disinfection, 2005,(4):414-415.
- [12] 韩建辉.养猪场常用的消毒方法及影响消毒效果的因素[J].养殖技术顾问,2011,(9):170.
Han J H. Commonly methods of disinfection and influencing factors on disinfection effect of disinfectant in pig farm[J]. Technical Advisor for Animal Husbandry, 2011,(9):170.
- [13] 安云科.影响消毒剂效果的因素及选择消毒药的原则[J].黑龙江畜牧兽医,2012,(2):78-79.
An Y K. Influencing factors on disinfection effect of disinfectant and principle on disinfectant choose[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2012,(2):78-79.