

过硫酸氢钾复合物粉对不同菌株的消毒效果研究

杨绒娟, 李朋朋, 周德刚* (国家兽用药品工程技术研究中心/洛阳惠中兽药有限公司, 河南洛阳 471003)

摘要 通过设计过硫酸氢钾复合物粉对马腺疫链球菌兽疫亚种及多杀性巴氏杆菌的定量、定性杀灭试验, 对该消毒剂的消毒效果进行研究。结果显示: 过硫酸氢钾复合物粉 1 600 倍稀释时对马腺疫链球菌兽疫亚种的杀菌率为 100%; 3 200 倍稀释时对多杀性巴氏杆菌杀菌率为 100%。过硫酸氢钾复合物粉对马腺疫链球菌兽疫亚种的最低有效浓度为 3 200 倍稀释, 该浓度的最短作用时间为 60 min; 对多杀性巴氏杆菌的最低有效浓度为 3 200 倍稀释, 该浓度的最短作用时间为 30 min。

关键词 过硫酸氢钾复合物粉; 细菌定量试验; 细菌定性试验

中图分类号 S859.79⁺9.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)14-0085-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.14.023

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on the Disinfection Effect of Potassium Monopersulfate Triple Salt Composite Powder on Different Strains

YANG Rong-juan, LI Peng-peng, ZHOU De-gang (National Research Center for Veterinary Medicine/Luoyang Huizhong Animal Medicine Co., Ltd., Luoyang, Henan 471003)

Abstract The disinfection effect of the disinfectant was studied by observing the quantitative and qualitative killing test of potassium monopersulfate triple salt composite powder on *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* and *Pasteurella multocida*. The results showed that the bactericidal rate of potassium monopersulfate triple salt composite powder to *S. equi* subsp. *zooepidemicus* was 100% at 1 600 times dilution and to *P. multocida* was 100% at 3 200 times dilution. The minimum effective concentration of potassium monopersulfate triple salt composite powder to *S. equi* subsp. *zooepidemicus* was 3 200 times of dilution, and the shortest action time of this concentration was 60 min; the minimum effective concentration to *P. multocida* was 3 200 times of dilution, and the shortest action time of this concentration was 30 min.

Key words Potassium monopersulfate triple salt composite powder; Bacterial quantitative test; Bacterial qualitative test

动物性疫病是影响当代养殖业发展的主要因素, 我国提倡“预防为主, 防治结合”的方针政策, 使用消毒剂对畜舍及其周围环境消毒是预防疫病必不可少的措施^[1]。过硫酸氢钾复合物粉是由过硫酸氢钾 KHSO_5 (PMS)、硫酸氢钾 KHSO_4 和硫酸钾 K_2SO_4 这 3 种物质组成, KHSO_5 为其主要成分, 具有强氧化性, 易溶于水^[2], 杀菌原理主要是利用单过硫酸氢钾的特殊氧化能力和链式反应, 即在水中不断产生新生态氧、次氯酸、自由羟基、过氧化氢, 通过新生态氧和自由羟基的氧化作用可以改变细胞膜的通透性使之破裂, 从而达到杀灭病原微生物的目的^[3]。过硫酸氢钾复合物粉作为一种广谱、高效、低毒的兽用复方消毒剂被广泛关注^[4]。为观察验证过硫酸氢钾复合物粉的消毒效果, 笔者拟研究过硫酸氢钾复合物粉对马腺疫链球菌兽疫亚种及多杀性巴氏杆菌的消毒效果。

1 材料与方

1.1 试剂 营养肉汤、营养琼脂, 购自青岛高科园海博生物技术有限公司; 小牛血清, 购自郑州益康生物有限公司; 硫代硫酸钠(五水), 分析纯, 购自成都市科龙化工试剂厂; 无水磷酸氢二钠、磷酸二氢钾, 分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 过硫酸氢钾复合盐, 购自上海安尔信化学有限公司。

磷酸盐缓冲液(PBS, 0.03 mol/L): 无水磷酸氢二钠 2.83 g, 磷酸二氢钾 1.36 g, 纯化水加至 1 000 mL, 待完全溶解后, 于 121 °C 高压灭菌 20 min。

中和剂(0.5% 硫代硫酸钠): 硫代硫酸钠 2 g, 纯化水加至

400 mL, 待完全溶解后, 于 121 °C 高压灭菌 20 min。

1.2 主要仪器设备 JA2003 电子天平(上海上平仪器有限公司); NU-425-400S 生物安全柜(美国 Nuaire); 电热恒温培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司); 全自动立式电热压力蒸汽灭菌器(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司); 微量移液器(德国 Eppendorf 公司); 涡旋混合器(德国 IKA 公司)。

1.3 菌株 大肠杆菌 8099、马腺疫链球菌兽疫亚种 CVCC556、多杀性巴氏杆菌 CVCC399, 购自中国兽医药品监察所。

1.4 药品 以过硫酸氢钾复合盐为主成分, 氨基磺酸、苹果酸、氯化钠、十二烷基苯磺酸钠、六偏磷酸钠等为辅料, 参照专利 US4822512^[5] 制得过硫酸氢钾复合物粉消毒剂。

1.5 方法

1.5.1 菌悬液的制备。 取出菌种冻干粉, 用接种环蘸取少量干粉在培养基上划线, 37 °C 培养 20 h(第一代)。从生长良好的平板上挑取单个菌落, 在培养基上划线, 37 °C 培养 20 h(第二代)。从传代后的平皿上挑取 4~10 个典型菌落至 PBS 中, 取部分菌悬液用核酸蛋白测定仪测定 OD_{600} , 将剩余菌悬液的 OD_{600} 调整至 0.14~0.18, 按此比例调整剩余菌液, 混合均匀后进行倍比稀释, 将上述菌悬液用平板计数法进行多次细菌计数。摸索细菌含量符合《兽用消毒剂鉴定技术规范》^[6] 第三、四章中规定的调整方法, 按照此方法制备菌悬液作为工作菌液进行试验, 菌悬液现用现配, 不得过夜使用。

1.5.2 中和剂的选择。 用 0.5% 的硫代硫酸钠溶液作为中和剂, 以大肠杆菌作为指示菌进行试验, 用无菌纯化水稀释消毒剂。

作者简介 杨绒娟(1991—), 女, 山西运城人, 硕士, 从事新兽药的开发与研究。* 通信作者, 高级兽医师, 从事新兽药的开发与研究。

收稿日期 2019-12-04

试验分组如下:第1组,消毒剂+菌悬液,证明消毒剂在试验浓度下是否有杀菌或抑菌作用。0.5 mL 消毒剂与4.5 mL工作菌液混匀作用5 min,吸取0.5 mL作用液与4.5 mL PBS混匀,吸取0.1 mL最终样液接种至营养琼脂平皿。

第2组,(消毒剂+菌悬液)+中和剂,证明中和剂能否中和和残留消毒剂的抑菌作用。0.5 mL 消毒剂与4.5 mL工作菌液混匀作用5 min,吸取0.5 mL作用液与4.5 mL中和剂混匀作用10 min,吸取0.1 mL中和产物原液接种至营养琼脂平皿。

第3组,中和剂+菌悬液,证明中和剂是否抑菌。0.5 mL工作菌液和4.5 mL纯化水混匀作用5 min,吸取0.5 mL作用液与4.5 mL中和剂混匀作用10 min,最终样液用PBS进行10倍系列稀释,取 10^{-2} 、 10^{-3} 接种至营养琼脂平皿。

第4组,(消毒剂+中和剂)+菌液,证明消毒剂与中和剂的反应产物有无抑菌作用。0.5 mL 消毒剂和4.5 mL中和剂混匀作用10 min,吸取4.5 mL作用液与0.5 mL工作菌液混匀作用5 min,最终样液用PBS进行10倍系列稀释,取 10^{-2} 、 10^{-3} 接种至营养琼脂平皿。

第5组,稀释液(PBS)+菌悬液,作为阳性对照,证明菌种与培养基是否合适。取0.5 mL菌悬液与4.5 mL纯化水混匀,吸取0.5 mL混合液与4.5 mL PBS混匀,最终样液用PBS进行10倍系列稀释,取 10^{-2} 、 10^{-3} 接种至营养琼脂平皿。

第6组,稀释液(PBS)、中和剂、未接种培养基,作为阴性对照,证明培养基及试剂是否污染。分别吸取稀释液(PBS)、中和剂0.1 mL接种至营养琼脂平皿。

将上述培养皿置于37℃培养箱,培养20 h,观察结果。

1.5.3 过硫酸氢钾复合物粉对微生物的定量杀灭试验。用无菌纯化水按不同稀释倍数溶解并稀释过硫酸氢钾复合物粉作为供试消毒剂。吸取0.5 mL工作菌液于各供试消毒剂中作用5 min,取作用液0.5 mL于4.5 mL中和剂作用10 min。以PBS代替消毒剂,同时进行上述步骤,作为阳性对照组,同时设阴性对照组。最终样液用PBS 10倍系列稀释,于含10%血清的营养琼脂平皿上进行活菌计数。当消毒剂最高稀释倍数的杀菌率均在99.9%以上时,可判定该稀释倍数为消毒剂的有效杀菌浓度。该试验重复进行3次,以3次试验杀菌率的平均值表示最终杀菌率。

杀菌率(P_t)= $(N_0-N_t)/N_0 \times 100\%$,其中 N_0 为对照组的活菌数, N_t 为试验组的活菌数。

1.5.4 过硫酸氢钾复合物粉对微生物的定性杀灭试验。用无菌纯化水按不同稀释倍数溶解并稀释过硫酸氢钾复合物粉作为供试消毒剂。取稀释好的工作菌液2.5 mL加入到2.5 mL供试消毒剂中,计时5、10、15、30、60 min,分别取0.5 mL作用液加入4.5 mL中和剂作用10 min。取0.5 mL终样液加入4.5 mL含10%血清的营养肉汤中,置于37℃培养箱内培养,观察结果。以PBS代替消毒剂,其他操作同上述步骤,作为阳性对照组,同时设培养基对照(P),每种菌的定

性试验均重复3次。培养物发生浑浊即表示有细菌生长,若不变浑浊,继续培养至第7天,若仍不浑浊方可判为无菌生长。以无菌生长管消毒剂的最低浓度为最低杀菌有效浓度,以无菌生长管的最短消毒时间为该浓度杀菌最快有效时间。

2 结果与分析

2.1 菌悬液制备条件摸索结果 中和剂工作菌液:大肠杆菌8099调至 OD_{600} 为0.14,再进行2倍稀释时菌液浓度为 10^7 CFU/mL。

细菌定量试验工作菌液:马腺疫链球菌兽疫亚种CVCC556调至 OD_{600} 为0.18,再进行10倍稀释时菌液浓度为 $7.3 \times 10^6 \sim 4.2 \times 10^7$ CFU/mL;多杀性巴氏杆菌CVCC399调至 OD_{600} 为0.15,再进行10倍稀释时菌液浓度为 $8.7 \times 10^6 \sim 5.0 \times 10^7$ CFU/mL。

细菌定性试验工作菌液:马腺疫链球菌兽疫亚种CVCC556调至 OD_{600} 为0.18,再进行100倍稀释时菌液浓度为 $8.3 \times 10^5 \sim 3.9 \times 10^6$ CFU/mL;多杀性巴氏杆菌CVCC399调至 OD_{600} 为0.15,再进行100倍稀释时菌液浓度为 $7.6 \times 10^5 \sim 4.1 \times 10^6$ CFU/mL。

2.2 中和剂选择结果 中和剂选择试验以大肠杆菌8099为指示菌,试验中所用消毒剂的浓度为杀菌试验中使用的最高浓度,即1:100稀释。由表1可知,0.5%硫代硫酸钠可有效中和过硫酸氢钾复合物粉水溶液。

表1 中和剂选择试验结果

Table 1 Test results of neutralizer selection CFU/mL

组别 Group	菌落数 Number of colonies	
	过硫酸氢钾溶液 Potassium monopersulfate triple salt solution	CID2000
1 消毒剂+菌悬液	3.5×10^3	5.0×10^3
2 (消毒剂+菌悬液)+中和剂	4.4×10^4	4.0×10^4
3 中和剂+菌悬液	7.9×10^7	6.9×10^7
4 (消毒剂+中和剂)+菌液	8.0×10^7	7.5×10^7
5 稀释液+菌悬液	7.6×10^7	7.1×10^7
6 稀释液	0	0
中和剂	0	0
未接种培养基	0	0

2.3 细菌定量试验结果 过硫酸氢钾复合物粉对马腺疫链球菌兽疫亚种及多杀性巴氏杆菌的定量试验结果见表2。由表2可知,过硫酸氢钾复合物粉对马腺疫链球菌兽疫亚种的有效杀菌浓度为1 600倍稀释,对多杀性巴氏杆菌的有效杀菌浓度为3 200倍稀释。

2.4 细菌定性试验结果 过硫酸氢钾复合物粉对马腺疫链球菌兽疫亚种及多杀性巴氏杆菌的定性试验结果见表3。由表3可知,过硫酸氢钾复合物粉对马腺疫链球菌兽疫亚种的最低有效浓度为3 200倍稀释,该浓度的最短作用时间为60 min;过硫酸氢钾复合物粉对多杀性巴氏杆菌的最低有效浓度为3 200倍稀释,该浓度的最短作用时间为30 min。

表 2 过硫酸氢钾复合物粉对不同菌株的定量杀灭试验结果

Table 2 Quantitative killing test results of different strains by potassium monopersulfate triple salt composite powder

菌株 Strain	稀释倍数 Dilution multiple						%
	1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	
马腺疫链球菌兽疫亚种 CVCC556	100	100	100	100	99.40	99.01	
<i>Streptococcus equi</i> subsp.zooepidemicus CVCC556							
多杀性巴氏杆菌 CVCC399 <i>Pasteurella multocida</i> CVCC399	100	100	100	100	100	98.74	

注:数据为 3 次试验的平均值,CVCC556、CVCC399 的菌液浓度分别为 8.8×10^6 、 1.5×10^7 CFU/mL

Note: The data was the average value of three tests, and the bacterial solution concentrations of CVCC556 and CVCC399 were 8.8×10^6 and 1.5×10^7 CFU/ mL, respectively

表 3 过硫酸氢钾复合物粉对不同菌株的定性杀灭试验结果

Table 3 Qualitative killing test results of different strains by potassium monopersulfate triple salt composite powder

菌株 Strain	作用时间 Action time min	稀释倍数 Dilution multiple					
		1:200	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400
马腺疫链球菌兽疫亚种 CVCC556	5	-	-	-	-	+	+
<i>Streptococcus equi</i> subsp.zooepidemicus CVCC556	10	-	-	-	-	+	+
	15	-	-	-	-	+	+
	30	-	-	-	-	+	+
	60	-	-	-	-	-	+
	60	-	-	-	-	-	+
多杀性巴氏杆菌 CVCC399 <i>Pasteurella multocida</i> CVCC399	5	-	-	-	-	+	+
	10	-	-	-	-	+	+
	15	-	-	-	-	+	+
	30	-	-	-	-	-	+
	60	-	-	-	-	-	+

注:+表示混浊,-表示澄清,数据为 3 次试验结果整理,CVCC556、CVCC399 的菌液浓度分别为 9.70×10^5 、 9.95×10^5 CFU/mL

Note: + indicated turbidity, - indicated clarification, and the data was the result of three tests. The bacterial concentration of CVCC556 and CVCC399 were 9.70×10^5 and 9.95×10^5 CFU/mL, respectively

3 讨论

马腺疫链球菌兽疫亚种是重要的人兽共患病病原,能引起人和猪的脑膜炎、败血症、关节炎、心内膜炎、肺炎及突发性死亡,近年来由马腺疫链球菌兽疫亚种引起的猪链球菌病对我国养猪业造成巨大的经济损失^[7-8]。该试验所用的马腺疫链球菌兽疫亚种 CVCC556 分离基物为败血症猪心血,为强毒株。从过硫酸氢钾复合物粉对马腺疫链球菌兽疫亚种的定量、定性杀灭试验中可以看出当过硫酸氢钾复合物粉稀释 1 600 倍时杀菌率为 100%,最低有效浓度为 3 200 倍稀释,作用 60 min 培养基澄清,可达到消毒效果。

多杀性巴氏杆菌对多种动物和人类都有致病性,猪多杀性巴氏杆菌也称猪肺疫,是猪群中常见的呼吸道传染病,该病全年任何季节都能发生,也可继发其他传染病,最急性型患猪一般呈败血症,病猪往往突然发病并快速死亡,对养猪业危害较大^[9-10]。该试验所用的多杀性巴氏杆菌 CVCC399 分离于出血性败血症的猪。从过硫酸氢钾复合物粉对多杀性巴氏杆菌的定量、定性杀灭试验中可以看出当过硫酸氢钾复合物粉稀释 3 200 倍时杀菌率为 100%;最低有效浓度为 3 200 倍稀释,作用 30 min 培养基澄清,可达到消毒效果。

综上所述,过硫酸氢钾复合物粉对马腺疫链球菌兽疫亚种和多杀性巴氏杆菌具有良好的消毒效果。但该研究仅选择了 2 种致病菌进行效果验证,今后还需评估该消毒剂对其他常见病原的消毒效果,以完善可杀灭微生物的类别,对该产品在猪场中的应用起到指导作用。

参考文献

- [1] 张吉富.动物检疫中常用消毒剂的使用[J].湖北畜牧兽医,2006(3):13.
- [2] 吴杰星,韩卓璇,刘涛,等.过硫酸氢钾复合盐鉴定方法研究[J].当代化工研究,2019(3):115-117.
- [3] 宋海鹏,余姜.复合过硫酸氢钾系列产品在水处理和水产养殖中的应用[J].当代水产,2014(9):60-61.
- [4] 李娜.过硫酸氢钾复合盐颗粒剂消毒效果评价[D].南京:南京农业大学,2016.
- [5] AUCHINCLOSS T R. Biocidal, particularly virucidal, compositions; US-4822512[P].1989-04-18.
- [6] 中华人民共和国农业部.兽用消毒剂鉴定技术规范[S].北京:[出版者不详],1992.
- [7] 耿建新,陆承平,范红结.马链球菌兽疫亚种 10 株国内猪源分离株对小鼠免疫效力的评价[J].中国人兽共患病学报,2007,23(2):201-204.
- [8] 苏良科,陆承平.马链球菌兽疫亚种类 M 蛋白亚单位疫苗小鼠免疫效果评价[J].农业生物技术学报,2004,12(2):226-227.
- [9] 吴云海.猪多杀性巴氏杆菌病的综合防治[J].畜牧兽医科技信息,2019(2):108.
- [10] 苏晓琦.猪多杀性巴氏杆菌病的流行病学、症状、诊断及防控措施[J].现代畜牧科技,2017(3):98.