

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.06.11

枸橼酸碘溶液对 4 种病原菌的载体消毒效果研究

李亚菲^{1,2}, 曾振灵¹, 梁先明^{3*}, 谭志坚⁴, 贾 谏¹

(1.华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 2.广东省农业科学院农产品公共监测中心, 广州 510640;

3.中国兽医药品监察所, 北京 100081; 4.佛山市正典生物技术有限公司, 广东佛山 528138)

[收稿日期] 2017-07-12 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 06-0064-08 [中图分类号] S859.799.1

[摘 要] 通过载体定量试验考察枸橼酸碘溶液的消毒效果, 同时选择百胜-30 溶液作对照。结果表明, 在橡胶片载体、室温条件下 (20 ℃ 左右), 枸橼酸碘溶液按 1 : 500 稀释、作用 5 min 对大肠杆菌杀灭率达 99.90% 以上; 按 1 : 1000 稀释、作用 5 min 对金黄色葡萄球菌即可起到杀菌作用; 按 1 : 1200 稀释, 最低作用 10 min, 杀菌率才能达标; 当稀释倍数为 1 : 1200、作用 30 min 对马腺疫链球菌才能达到杀菌效果, 当药物浓度提高至 1 : 800 以上时, 作用 10 min 杀菌率即可达到 99.90% 以上; 按 1 : 10 稀释、作用 1.5 h 对蜡样芽孢杆菌杀灭率才达 99.90% 以上, 当药物浓度提高到 1 : 8 及以上时, 作用 30 min 杀灭率才能达标。与受试消毒剂药物相比, 百胜-30 溶液对大肠杆菌和马腺疫链球菌的杀灭效果好, 对金黄色葡萄球菌起作用时间略晚, 对蜡样芽孢杆菌的杀灭效果不如枸橼酸碘溶液。两种消毒剂对不同病原菌的载体消毒效果不同。

[关键词] 枸橼酸碘; 消毒剂; 载体; 病原菌

Germicidal Efficacy of Citrate and Iodine Solution against Four Pathogens on Carriers

LI Ya-fei^{1,2}, ZENG Zhen-ling¹, LIANG Xian-ming^{3*}, TAN Zhi-jian⁴, JIA Jian¹

(1. Veterinary College, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Public Monitoring Center for Agro-product of Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

3. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 4. Foshan Standard Biotech Co Ltd, Foshan, Guangdong 528138, China)

Corresponding author: LIANG Xian-ming, E-mail: liangxianming@ivdc.org.cn

Abstract: Carrier quantitative test was carried out to evaluate the germicidal efficacy of citrate and iodine solution against four pathogens, Bai Sheng-30 solution used as control, which provided basis and reference for clinical application. The results were as follows: at room temperature (20 ℃) and on rubber piece carriers, citrate and iodine solution killed over 99.90% of *Escherichia coli* after exposure to 1 : 500 dilution for 5 min; it also killed 99.90% of *Staphylococcus aureus* after exposure to 1 : 1000 dilution for 5 min or after exposure to 1 : 1200 dilution for 10 min. The tested solution was bactericidal to *Streptococcus equinus* at 1 : 1200 dilution in 30 minutes or at 1 : 800 dilution in 10 minutes on the carriers. Besides, the dilution of 1 : 10 in 1.5 h or dilution of 1 : 8 in 0.5 h

作者简介: 李亚菲, 博士, 从事畜禽产品质量安全监测研究。

通讯作者: 梁先明。E-mail: liangxianming@ivdc.org.cn

of tested solution provided 99.90% of reduction of killing of *Bacillus cereus* at 20 °C. In contrast, the killing efficacy of Bai Sheng-30 solution was better against *E.coli* and *S.equinus*, but worse against *B.cereus*; it effected a little slower on *S.aureus*. The two solutions showed different disinfection effects on different pathogens.

Key words: citrate and iodine; disinfectant; carriers; pathogen

现代化养殖业中,养殖场使用消毒剂净化畜禽生长环境、消除病原微生物、减少病原菌的入侵、阻止疾病的引入和传播,从而预防和控制畜禽传染病的发生^[1-3]。科学选择和合理使用消毒剂,对于做好养殖场的消毒净化工作以及疫病的预防、控制、扑灭起到至关重要的作用^[4]。碘类化合物作为消毒剂的一种,已广泛应用于生产,其作用原理是通过氧化、碘代反应破坏细胞结构和酶系统等,从而达到杀菌目的^[5-6]。有研究表明,柠檬酸作为一种弱有机酸,也具有一定的抗菌作用^[7]。将两者制成复方消毒剂,克服了含碘消毒剂不稳定、易受环境酸碱性影响且容易产生刺激性和腐蚀性等优点,以期达到高效、广谱、低毒的特点。我国农业部 1992 年颁布了《兽用消毒剂鉴定技术规范》,详细介绍了评价兽用消毒剂的试验方法。试验方法与卫生部颁布的《消毒技术规范》相似,包括对细菌、芽孢、病毒作用效果的试验方法。根据以上标准,本研究评价复方枸橼酸碘溶液对 4 种病原菌的消毒效果,同时选择国外产品百胜-30 溶液作为对照,进行载体消毒试验,以期为该药在临床的应用提供依据和参考。

1 材料

1.1 供试药品 枸橼酸碘溶液:含碘 2.0%,佛山正典生物技术有限公司生产,批号 1211070。百胜-30 溶液:含碘 3.0%,英国 Evans 生产,批号 14744。

1.2 供试菌株 大肠杆菌 8099、金黄色葡萄球菌 ATCC6538、马腺疫链球菌兽疫亚种强毒 CVCC556、蜡样芽孢杆菌 8008,均为专用消毒剂鉴定菌种,购自中国兽医药品监察所。

1.3 主要试剂 营养肉汤、营养琼脂、胰蛋白胍大豆肉汤、胰蛋白胍大豆琼脂,购自广州环凯微生物科技有限公司,新生小牛血清购自北京普博欣生物科技有限公司,无菌脱纤维绵羊血购自广州蕊特生物有限公司,其他分析纯试剂磷酸氢二钠、氯化钠

购自广州化学试剂厂,无水氯化钙和氯化镁购自天津市科密欧化学试剂有限公司,磷酸二氢钾购自成都市科龙化工试剂厂,吐温-80 购自天津市化学试剂三厂,硫代硫酸钠购自天津市大茂化学试剂厂。

1.4 主要仪器 微量移液器:法国吉尔森公司;超净工作台:苏州净化设备有限公司;SN510C 高压灭菌锅:日本 YAMATO 公司;FA2004N 型电子分析天平:上海精密科学仪器有限公司;数显隔热式培养箱:上海锦屏仪器仪表有限公司通州公司;HZQ-F160 全温振荡培养箱:扬州市培英实验仪器有限公司;涡旋混合器:德国 IKA 公司;电子计时器:杭州精诚三合实业有限公司;显微镜:日本 OLYMPUS 公司。

1.5 溶液配制 标准硬水(硬度 342 mg/L):无水氯化钙 0.304 g,氯化镁 0.139 g,蒸馏水加至 1000 mL,121 °C 灭菌 20 min 即可。磷酸盐缓冲溶液(0.03 mol/L,pH 7.2):十二水合磷酸氢二钠 7.13 g,磷酸二氢钾 1.36 g,蒸馏水加至 1000 mL,121 °C 灭菌 20 min 即可。

2 试验方法

载体消毒试验方法,根据试验指导原则进行^[8]。

2.1 菌种的制备

2.1.1 细菌繁殖体悬液的制备 取冻干菌种管,在无菌操作下打开,加入适量营养肉汤,轻柔吹吸数次,使菌种融化分散。接种菌悬液于合适的液体培养基,置 37 °C 培养 18~24 h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液,划线接种于合适的固体培养基平板上,于 37 °C 培养 18~24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于合适的固体培养基平板上,于 37 °C 培养 18~24 h,即为第 3 代培养物。取第 3~14 代的固体培养基平板上的新鲜培养物(18~24 h)进行试验。将上述经传代后的菌种接种到合适的液体培养基,37 °C 培养 18~24 h 即得到细菌悬液。

悬液应当天使用不得过夜。

2.1.2 细菌芽孢悬液的制备 取冻干菌种管,在无菌操作下打开,加入适量营养肉汤,轻柔吹吸数次,使菌种融化分散。接种菌悬液于合适的液体培养基,置 37 ℃ 培养 18~24 h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液,划线接种于合适的固体培养基平板上,于 37 ℃ 培养 18~24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于合适的固体培养基平板上,于 37 ℃ 培养 5~7 d 后挑取少许菌苔作芽孢染色镜检。当每个视野内的芽孢数达 90%~95% 以上时,可收集芽孢。

芽孢染色方法:①用接种环蘸取菌样涂布于玻片上,待自然干燥。然后通过火焰加热将菌固定于玻片上。②将涂片放入平皿内,片上放两层滤纸,滴加足量的 5.0% 孔雀绿水溶液。将平皿盖好,放 54~56 ℃ 条件下,加热 30 min。取出,去滤纸,用自来水冲洗残留孔雀绿溶液。③加 0.5% 沙黄水溶液,染 1 min。水洗,待干后镜检。芽孢呈绿色,菌体呈红色。

芽孢收集方法:在无菌操作下于琼脂培养基平板中加入 4.0 mL 无菌蒸馏水,使其浸润菌苔,再以涂布棒轻轻推刮下菌苔(小心勿将琼脂刮破)。吸取第 1 批洗下的菌悬液于无菌离心管中,再加 4.0 mL 无菌蒸馏水重复洗一遍。将第 1 和第 2 批洗下的菌悬液集中于一个无菌离心管内,以 3000 r/min 速度离心 10 min。弃上清液,加入少量无菌蒸馏水悬浮菌体,再离心,如此重复 3 次。最后将浓缩的芽孢悬液置于 80 ℃ 水浴中 10 min,以杀灭残余的细菌繁殖体。待冷至室温后,保存于 4 ℃ 冰箱中备用。芽孢悬液在使用时,应先进行活菌培养计数。

2.2 中和剂筛选实验 以大肠杆菌 8099 和金黄色葡萄球菌 ATCC6538 为指示菌。中和剂拟采用含硫代硫酸钠、吐温-80 的营养肉汤,使用前高压灭菌。消毒剂用无菌硬水稀释为一定浓度,稀释液用 0.03 mol/L 的无菌磷酸盐缓冲液。试验按以下分组进行:第一组:消毒剂+菌悬液。吸取 1.0 mL 试验菌悬液与 4.0 mL 消毒剂于试管内,涡旋 20 s,混

匀。作用至预定时间,吸此样液 0.5 mL 加于含有 4.5 mL 稀释液的试管中,混匀。吸取该最终样液 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 ℃ 培养计数。第二组:(消毒剂+菌悬液)+中和剂。吸取 1.0 mL 试验菌悬液与 4.0 mL 消毒剂试管内,混匀。作用至预定时间,吸此样液 0.5 mL 加于含 4.5 mL 中和剂溶液试管中,涡旋 20 s,混匀,作用 10 min。吸取该最终样液 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 ℃ 培养计数。第三组:中和剂+菌悬液。吸取 0.1 mL 试验菌悬液与 4.9 mL 中和剂于试管内,涡旋 20 s,混匀,作用 10 min。吸取该最终样液 0.5 mL,用中和剂做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,各吸取 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 ℃ 培养计数。第四组:中和产物+菌悬液。吸取 0.1 mL 试验菌悬液与 4.9 mL 中和产物溶液(以 0.4 mL 消毒剂加 4.5 mL 中和剂,作用 10 min 配制而成)于试管内,混匀。作用 10 min,吸取该最终样液 0.5 mL,用中和产物溶液做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,各吸取 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 ℃ 培养计数。第五组:稀释液+菌悬液。吸取 0.1 mL 试验菌悬液与 4.9 mL 稀释液于试管内,作用 10 min。吸取该最终样液 0.5 mL,用稀释液做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,各吸取 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 ℃ 培养计数。第六组:空白对照组。分别取中和剂、稀释液、无菌硬水 0.1 mL 涂布于琼脂平皿中,置 37 ℃ 培养计数。

2.3 载体消毒实验

2.3.1 载体制作 根据试验目的、可能性、需要以及制作的可行性,选用橡胶片作为载体制作菌片,用橡胶手套剪制成大小为 $0.5 \times 1.0 \text{ cm}^2$,先脱脂,即用 1% 洗衣粉溶液煮沸 30 min,再用自来水洗净。用蒸馏水再煮沸 10 min,再漂洗 3 次。晾干。

2.3.2 染菌 把预先培养好的菌液稀释好,将经灭菌的载体片平铺于无菌平皿内,逐片滴加菌液。每片滴加菌液 10 μL 。用 10 μL 移液器接灭菌塑料吸头滴染菌液,并用接种环涂匀整个载体表面,染菌 $10^5 \sim 10^6$ 个以上,并使之分布均匀。滴染菌液后,染菌载体可置 37 ℃ 温箱内干燥(约 20~30 min)

备用。

2.3.3 消毒 将消毒液按预先的浓度稀释好,再将菌片浸入消毒液中,放入恒温箱内,立即记时。以 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液代替消毒液,作为对照组。

2.3.4 中和与培养 定性试验:作用预定时间后,将菌片分别放入含足量中和剂的试管,中和 10 min,再取出放入液体培养基内,置 37 ℃ 培养 24 h。若发生混浊即表示有细菌生长。必要时,可移植到固体培养基上,观察菌落形态,或进行涂片染色镜检,以判断生长的是否为试验菌,以排除污染。若肉汤不变混浊,应继续培养至第 7 天,若仍不混浊方可判为无菌生长。

定量试验:根据定性试验结果初步判定消毒剂作用时间和浓度,进行定量试验。取出菌片放于有玻璃珠的中和液内,振摇 100 次洗脱载体上的细菌,然后进行活菌计算及统计分析。以无菌生长管消毒液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。

杀菌率的计算:根据活菌计数的结果,计算杀菌率(Pt)。消毒 t 时的杀菌率(Pt)= $[(n_0-n_t)/n_0] \times 100\%$,式中 n_0 为消毒前或对照组活菌数。 n_t 为消毒后或实验组活菌数。

3 结果与分析

3.1 中和剂鉴定试验 中和剂的鉴定选择大肠杆菌 8099 和金黄色葡萄球菌 ATCC6538 为代表进行试验。试验中所用消毒剂的浓度为杀菌试验中使用的最高浓度,即针对大肠杆菌 8099,2% 柠檬酸碘溶液按 1 : 2500 稀释,百胜-30 溶液按 1 : 3750 稀释。针对金黄色葡萄球菌 ATCC6538,2% 柠檬酸碘溶液按 1 : 5000 稀释,百胜-30 溶液按 1 : 7500 稀释。

结果表明,含 0.3% 硫代硫酸钠、1% 吐温-80 的灭菌营养肉汤中和剂可以有效中和 2% 柠檬酸碘溶液。含 0.5% 硫代硫酸钠、1% 吐温-80 的灭菌营养肉汤中和剂可以有效中和剂百胜-30 溶液。以上两种中和剂、中和产物对细菌生长无明显影响(表 1)。

表 1 中和剂鉴定试验结果

Tab 1 The test for the identification of neutralizer

组别	大肠杆菌 8099(CFU/mL)		金黄色葡萄球菌 ATCC6538(CFU/mL)	
	受试药	对照药	受试药	对照药
消毒剂+菌悬液	2	2	0	0
(消毒剂+菌悬液)+中和剂	56	107	33	16
中和剂+菌悬液	2.9×10 ⁷	2.5×10 ⁷	3.2×10 ⁷	2.45×10 ⁷
(消毒剂+中和剂)+菌悬液	4.1×10 ⁷	2.87×10 ⁷	2.58×10 ⁷	3.1×10 ⁷
稀释液+菌悬液	3.3×10 ⁷	3.2×10 ⁷	2.8×10 ⁷	2.52×10 ⁷
稀释液	0	0	0	0
硬水	0	0	0	0

试验条件均为 20±1 ℃,作用时间为 5 min;以上结果为 3 次试验的平均值

3.2 定性试验结果 在室温条件下(20 ℃ 左右),在橡胶片载体上时,对于大肠杆菌 8099,2% 枸橼酸碘溶液最低杀菌有效浓度为 1 : 320,该浓度的最短消毒时间为 5 min;对于金黄色葡萄球菌 ATCC6538 和马腺疫链球菌兽疫亚种强毒 CVCC 556,2% 枸橼酸碘溶液最低杀菌有效浓度为 1 : 640,该浓度的最短消毒时间为 5 min。对照组百胜-30 溶液按

1 : 1920 稀释时,对上述三种菌株的作用时间为 1 h;当浓度提高到 1 : 960 时,对三种菌的最短作用时间是 5 min。对于蜡样杆菌芽孢,2% 枸橼酸碘溶液最低杀菌有效浓度为 1 : 1,该浓度的最短消毒时间为 10 min;对照组百胜-30 溶液最低杀菌有效浓度为 1 : 1,该浓度的最短消毒时间为 30 min。详细结果见表 2~表 4。

表 2 2%枸橼酸碘消毒剂对三种细菌定性杀菌效果

Tab 2 The qualitative germicidal effect of 2% citrate iodine solution on three kinds of bacteria

作用时间	最终浓度																				
	1：80			1：160			1：320			1：640			1：1280			1：2560			1：5120		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
5 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

A 代表大肠杆菌 8009,B 代表金黄色葡萄球菌 ATCC6538,C 代表马腺疫链球菌兽疫亚种强毒 CVCC556;“+”表示有细菌生长,“-”表示无细菌生长;阳性对照均浑浊;表内结果是 3 次试验的平均值

表 3 百胜-30 消毒剂对三种细菌定性杀菌效果

Tab 3 The qualitative germicidal effect of Bai Sheng-30 solution on three kinds of bacteria

作用时间	最终浓度																				
	1：120			1：240			1：480			1：960			1：1920			1：3840			1：7680		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
5 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
60 min	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

此消毒剂含碘量为 3%,按照最终含碘量一致的原则,稀释倍数参考受试消毒剂;A 代表大肠杆菌 8009,B 代表金黄色葡萄球菌 ATCC6538,C 代表马腺疫链球菌兽疫亚种强毒 CVCC556;“+”表示有细菌生长,“-”表示无细菌生长;阳性对照均浑浊;表内结果是 3 次试验的平均值

表 4 两种消毒剂对蜡样芽胞杆菌 8008 定性杀菌效果

Tab 4 The qualitative germicidal effect of two kinds of solutions on *Bacillus cereus* 8008

消毒剂	作用时间	最终浓度						
		1：1	1：2	1：4	1：8	1：16	1：32	1：64
枸橼酸碘溶液	10 min	-	+	+	+	+	+	+
	30 min	-	-	-	+	+	+	+
	1 h	-	-	-	-	+	+	+
	1.5 h	-	-	-	-	+	+	+
	2 h	-	-	-	-	+	+	+
百胜-30 溶液	10 min	+	+	+	+	+	+	+
	30 min	-	+	+	+	+	+	+
	1 h	-	-	-	+	+	+	+
	1.5 h	-	-	-	-	+	+	+
	2 h	-	-	-	-	+	+	+

“+”表示有细菌生长,“-”表示无细菌生长。阳性对照均浑浊。表内结果是 3 次试验的平均值

3.3 定量试验结果 对四种病原菌的杀灭效果见 表 5~表 6。在室温条件(20 ℃左右)、橡胶片载 体上时,对于大肠杆菌 8099,2%枸橼酸碘溶液按 1：500稀释,5 min 杀灭率均达 99.90%以上,当稀

释倍数再提高,即使作用时间延长,其杀菌率也不能达标;对照消毒剂百胜-30 溶液按照 1 : 900 稀释,5 min 杀灭率也达 99.90%以上(表 5)。

如表 5 所示,对于金黄色葡萄球菌 ATCC6538,2%枸橼酸碘溶液按 1 : 1000 稀释,5 min 杀灭率均达 99.90%以上,当稀释倍数提高到 1 : 1200,最低作用时间是 10 min,相对应的百胜-30 溶液按照 1 : 1800稀释,最低作用 10 min,杀菌率才能达标,即使提高消毒剂浓度,最低作用 10 min,其杀菌率才能达 99.90%以上。对于马腺疫链球菌兽疫亚种强毒 CVCC 556,2%枸橼酸碘溶液按照 1 : 1200 稀

释,30 min 杀灭率达 99.90%以上,当浓度再提高至 1 : 800 以上时,作用 10 min 杀灭率均达 99.90%以上,相对应的百胜-30 溶液,按照 1 : 1800 稀释时,5 min 杀灭率均达 99.90%以上。

如表 6 所示,对于蜡样杆菌 8008 芽孢,枸橼酸碘溶液按 1 : 10 稀释,1.5 h 杀灭率才达 99.90%以上,当药物浓度提高到 1 : 8 以及更高浓度时,作用 30 min 杀灭率才能达标;对照组百胜-30 溶液,按 1 : 10稀释时,作用 1.5 h,杀灭率才达 99.90%以上,当药物浓度提高 1 : 6 稀释时,作用 1 h,杀灭率才能达标。

表 5 两种消毒剂对三种细菌定量杀菌试验结果

Tab 5 The quantitative germicidal effect of two kinds of solutions on three kinds of bacteria

细菌	消毒剂	稀释倍数	不同作用时间平均杀菌率				
			5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
大肠杆菌 8099	枸橼酸碘溶液	1 : 300	100%	100%	100%	100%	100%
		1 : 400	99.99%	99.99%	100%	100%	100%
		1 : 500	99.92%	99.93%	99.96%	99.96%	99.96%
		1 : 600	<99.90%	<99.90%	<99.90%	<99.90%	<99.90%
	百胜-30 溶液	1 : 450	100%	100%	100%	100%	100%
		1 : 600	100%	100%	100%	100%	100%
		1 : 750	100%	100%	100%	100%	100%
		1 : 900	100%	100%	100%	100%	100%
金黄色葡萄球菌 ATCC6538	枸橼酸碘溶液	1 : 600	100%	100%	100%	100%	100%
		1 : 800	100%	100%	100%	100%	100%
		1 : 1000	99.97%	99.98%	100%	100%	100%
		1 : 1200	<99.90%	99.90%	99.93%	99.96%	99.96%
	百胜-30 溶液	1 : 900	<99.90%	100%	100%	100%	100%
		1 : 1200	<99.90%	100%	100%	100%	100%
		1 : 1500	<99.90%	100%	100%	100%	100%
		1 : 1800	<99.90%	100%	100%	100%	100%
马腺疫链球菌 兽疫亚种强毒 CVCC556	枸橼酸碘溶液	1 : 600	<99.90%	99.90%	100%	100%	100%
		1 : 800	<99.90%	99.90%	100%	100%	100%
		1 : 1000	<99.90%	<99.90%	<99.90%	99.99%	100%
		1 : 1200	<99.90%	<99.90%	<99.90%	99.97%	100%
	百胜-30 溶液	1 : 900	99.99%	100%	100%	100%	100%
		1 : 1200	99.99%	100%	100%	100%	100%
		1 : 1500	99.99%	100%	100%	100%	100%
		1 : 1800	99.98%	100%	100%	100%	100%

对照组菌数为 10⁶CFU/mL;枸橼酸碘溶液按 1 : 300、1 : 400、1 : 500、1 : 600 稀释后,分别与百胜-30 溶液按 1 : 450、1 : 600、1 : 750、1 : 900 稀释后,最终碘含量一致。枸橼酸碘溶液按 1 : 600、1 : 800、1 : 1000、1 : 1200 稀释后,分别与百胜-30 溶液分别按 1 : 900、1 : 1200、1 : 1500、1 : 1800 稀释后,最终碘含量一致;表内结果是 3 次试验的平均值

表 6 两种消毒剂对蜡样芽胞杆菌 8008 芽孢定量杀菌试验结果

Tab 6 The quantitative germicidal effect of two solutions against *Bacillus cereus* 8008

消毒剂	稀释倍数	不同作用时间平均杀菌率				
		10 min	30 min	1 h	1.5 h	2 h
枸橼酸碘溶液	1 : 6	<99.90%	100%	100%	100%	100%
	1 : 8	<99.90%	99.96%	99.99%	99.99%	99.99%
	1 : 10	<99.90%	<99.90%	<99.90%	99.96%	99.96%
	1 : 12	<99.90%	<99.90%	<99.90%	<99.90%	<99.90%
百胜-30 溶液	1 : 6	<99.90%	<99.90%	99.98%	100%	100%
	1 : 8	<99.90%	<99.90%	<99.90%	99.99%	99.98%
	1 : 10	<99.90%	<99.90%	<99.90%	99.96%	99.96%
	1 : 12	<99.90%	<99.90%	<99.90%	<99.90%	<99.90%

对照组菌数为 10⁶CFU/mL;枸橼酸碘溶液与百胜-30 分别按 1 : 6、1 : 8、1 : 10、1 : 12 稀释;表内结果是 3 次试验的平均值

4 讨论与小结

影响消毒剂杀菌作用的因素有药物浓度、作用时间、温度等^[9]。微生物附着于不同的载体,也会影响消毒和灭菌效果^[10-11]。本试验初步证明了受试菌株(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、马腺疫链球菌和蜡样芽胞杆菌)附着在橡胶片载体上时,枸橼酸碘溶液和百胜-30 溶液的杀菌效果。上述试验结果是建立在两种消毒剂按一定比例稀释后,最终碘含量一致的前提下(将枸橼酸碘溶液稀释为相应倍数时,消毒剂百胜-30 溶液稀释倍数为上述消毒剂稀释倍数乘以 1.5)得到的。对于蜡样芽胞杆菌,在定性试验中,消毒剂百胜-30 稀释倍数为 1 : 1 时,作用 10 min 也无作用,因此,在定量试验中,其稀释浓度相应提高,稀释倍数与受试组药物一致。

通过载体定性、定量杀菌实验得出,在橡胶片载体上时,对于大肠杆菌 8099,枸橼酸碘溶液按 1 : 500 稀释,5 min 杀灭率均达 99.90% 以上;对于金黄色葡萄球菌 ATCC6538,枸橼酸碘溶液按 1 : 1000 稀释,5 min 杀灭率均达 99.90% 以上;稀释倍数为 1 : 1200 时,最低作用 10 min,杀菌率才能达到 99.90%;对于马腺疫链球菌兽疫亚种强毒 CVCC 556,枸橼酸碘溶液按照 1 : 1200 稀释,30 min 杀灭率均达 99.90% 以上,当药物浓度提高至 1 : 800 以上时,作用 10 min 杀菌率即可达到 99.90% 以上;对于蜡样杆菌 8008 芽孢,枸橼酸碘溶

液 1 : 10 稀释,1.5 h 杀灭率才达 99.90% 以上,当药物浓度提高到 1 : 8 及以上时,作用 30 min 杀灭率才能达标。

对照百胜-30 溶液对大肠杆菌的杀灭效果要明显强于枸橼酸碘溶液;对金黄色葡萄球菌的杀灭效力与枸橼酸碘溶液相比,起作用时间略晚一些;对马腺疫链球菌兽疫亚种强毒,对照百胜-30 溶液比枸橼酸碘溶液稍好;对蜡样芽孢,枸橼酸碘溶液的杀灭效果比百胜-30 溶液的杀灭效果略好。建议养殖场使用消毒剂前,综合考虑本场微生物污染的情况,合理选择消毒剂。此外,应交替使用不同的消毒剂,避免因长期使用一种消毒剂导致耐药菌产生,影响消毒效果。选择复方枸橼酸碘溶液进行消毒时,应确保消毒剂使用浓度和作用时间。

参考文献:

[1] 佟海山,陈遇英.我国兽用消毒剂的应用现状与对策[J].中国兽医杂志,2017,53(9):115-117.
Tong H S, Chen Y Y. The application status and countermeasures of veterinary disinfectant in China [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2017, 53(9): 115-117.

[2] 李亚菲,吴维辉,张展,等.广东省养禽场兽药使用现状调查[J].中国家禽,2017, 39(1):70-74.
Li Y F, Wu W Y, Zhang Z, et al. Investigation on the usage of veterinary drugs in poultry farms in Guangdong province [J]. China Poultry, 2017, 39(1): 70-74.

[3] 陈小强,王晶钰,张中航,等.规模化鸡场消毒剂的筛选与消

- 毒效果评价[J]. 动物医学进展, 2011, 32(11): 85-89.
- Chen X Q, Wang J Y, Zhang Z H, *et al.* Evaluation on selection of disinfectant and disinfection effects in scaled chicken farms [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2011, 32(11): 85-89.
- [4] 冯忠武. 合理选择和安全使用兽用消毒剂[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(21): 60-61.
- Feng Z W. Reasonable choice and safe use of veterinary disinfectant [J]. China Academic Journal, 2006, 42(21): 60-61.
- [5] 徐庆华. 含碘消毒剂及其应用技术[J]. 中国消毒学杂志, 2012, 29(4): 316-318.
- Xu Q H. Iodine disinfectant and its application technology [J]. Chinese Journal of Disinfection, 2012, 29(4): 316-318.
- [6] 岳欣荣, 张义冉, 贾立财, 等. 蛋鸡养殖场常用聚维酮碘类消毒剂的质量评估[J]. 中国家禽, 2015, 37(20): 57-59.
- Yue X R, Zhang Y R, Jia L C, *et al.* Quality assessment of polyvidone iodine solution used in laying farms [J]. China Poultry, 2015, 37(20): 57-59.
- [7] 王 晓, 赖发伟, 杨 宁, 等. 柠檬酸与热力协同消毒作用相关性试验研究[J]. 中国消毒学杂志, 2013, 30(1): 6-8.
- Wang X, Lai F W, Yang N, *et al.* Research on synergy disinfection effect and related performance of citric acid and thermal [J]. Chinese Journal of Disinfection, 2013, 30(1): 6-8.
- [8] 农业部兽药评审中心. 兽药注册资料汇编[M]. 北京: 农业部兽药评审中心, 2009.
- Center for Veterinary Drug Evaluation Ministry of Agriculture. Technical requirements assembly of veterinary drug Registration [M]. Beijing: Center for Veterinary Drug Evaluation Ministry of Agriculture, 2009.
- [9] 夏婵君, 原 霖, 肖志明, 等. 戊二醛季铵盐复方消毒剂杀菌效果及影响因素[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(7): 58-60.
- Xia L J, Yuan L, Xiao Z M, *et al.* Germicidal effect of glutaraldehyde and quaternary ammonium salt compound solution and its influencing factors [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2010, 46(7): 58-60.
- [10] 李东力, 刘希真, 陈春田, 等. 二氧化氯对不同载体污染菌的杀灭效果[J]. 中国消毒学杂志, 2003, 20(1): 44-45.
- Li D L, Liu X Z, Chen C T, *et al.* Efficacy of chlorine dioxide in killing contaminating bacteria on different carriers [J]. Chinese Journal of Disinfection, 2003, 20(1): 44-45.
- [11] 张 珍, 高富红, 潘贵珍, 等. 戊二醛苯扎溴铵溶液对载体的消毒试验[J]. 畜牧与兽医, 2016, 48(9): 125-127.
- Zhang Z, Gao F H, Pan G Z, *et al.* The germicidal efficacy of glutaraldehyde and benzalkonium bromide solution on carriers [J]. Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 48(9): 125-127.

(编辑: 侯向辉)