

氯甲酚纳米乳消毒剂杀灭大肠杆菌效果的影响因素试验观察

李小军¹, 张一帆², 潘明华², 杨雪峰^{2*}, 贺永惠²

(1. 河南省济源市动物卫生监督所, 河南 济源 454650; 2. 河南科技学院动物科技学院, 河南 新乡 453003)

摘要:为研究有机物、温度和pH对氯甲酚纳米乳消毒剂杀菌效果的影响, 本文以大肠杆菌为试验菌, 利用悬液定量杀灭试验方法进行试验。结果表明: 0%、25%和50%小牛血清对氯甲酚纳米乳消毒剂杀菌作用均无影响; 该消毒剂的杀菌效果随时间延长而增强, 且在(10±1)℃和(20±1)℃的条件下均有重度影响, (30±1)℃无影响; 在pH 4.64、6.67和8.68的条件下均无影响。结论如下: 有机物和pH对氯甲酚纳米乳消毒剂杀灭大肠杆菌的效果均无影响, 但在不同温度条件下影响不同, 临床实践应用时需注意。

关键词:氯甲酚; 纳米乳; 消毒剂; 大肠杆菌; 悬液定量杀灭试验; 有机物; 温度; pH

中图分类号: S851.36

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)04-0096-03

Influence Factors of Bactericidal Action of Chlorocresol Nanoemulsion Disinfectant against *Escherichia coli*

LI Xiaojun¹, ZHANG Yifan², PAN Minghua², YANG Xuefeng^{2*}, HE Yonghui²

(1. Animal Health Supervision Institute of Jiyuan City, Henan Province, Jiyuan 454650; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Organic matter, temperature and pH were studied on bactericidal efficacy of chlorocresol nanoemulsion disinfectant. Suspension quantitative killing test method was used with *E. coli* as test bacteria. The results showed that 0%, 25% and 50% calf serum had no effect on the bactericidal efficacy of chlorocresol nanoemulsion disinfectant. The bactericidal efficacy of the disinfectant increased with the prolongation of action time, both (10±1) °C and (20±1) °C had serious effects, but (30±1) °C had no effect. pH 4.64, 6.67 and 8.68 had all no effect. These results indicated that organic matter and pH had no effect on the bactericidal action of chlorocresol nanoemulsion disinfectant against *E. coli*. However, different temperatures had different effects, so attention should be paid to in clinical application.

Key words: Chlorocresol; Nanoemulsion; Disinfectant; *E. coli*; Suspension quantitative killing test; Organic matter; Temperature; pH

随着我国畜牧养殖业集约化、工业化程度不断提高, 畜禽饲养密度不断加大, 畜禽感染疫病的机会也日益增多。有效地使用消毒剂是防治疫病的关键措施之一。氯甲酚(chlorocresol)是一种酚类衍生物消毒剂, 不但能损害菌体细胞膜, 使菌体内含物逸出和蛋白质变性, 呈杀菌作用, 而

且还可通过抑制细菌脱氢酶和氧化酶等酶的活性呈现抑菌作用^[1-2]。由于其对细菌繁殖体、真菌和结核杆菌均有较强的杀灭作用^[3], 临床中常用较低浓度作为抑菌防腐剂^[4-6]、较高浓度作为杀菌消毒剂^[7], 其杀菌作用比非卤化酚类强20倍^[2], 主要适用于畜禽栏舍、车辆、器物及环境等消毒^[1-3, 8-9]。氯甲酚纳米乳消毒剂(chlorocresol nanoemulsion disinfectant)是一种新型消毒剂, 具有水溶性好、酚臭味弱、消毒作用强、生产工艺简单等优点^[10], 但目前尚未见其关于杀菌作用影响因素的研究报道。本试验以大肠杆菌为研究对象, 利用悬液定量杀灭试验方法, 进行了氯甲酚纳米乳消毒剂杀菌效果影响因素的试验观察, 旨在研究有机物、

收稿日期: 2019-11-05

基金项目: 河南省重大科技专项(171100110500); 河南科技学院“标志性创新工程”计划经费项目(2015ZD09)

作者简介: 李小军(1972-), 男, 高级兽医师, 硕士, 主要从事动物检疫与疫病防控研究。

通讯作者: 杨雪峰, 女, 博士, 教授, E-mail: yangxuefeng2003@126.com

温度和pH对该消毒剂杀菌作用的影响规律,为其在临床中的推广应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验菌种

试验菌种为8099大肠杆菌,由本校动物药理学教研室保存并提供。该菌悬液的密度为 $1\times 10^8\sim 5\times 10^8$ CFU/mL。

1.2 主要试剂

氯甲酚(国药集团化学试剂有限公司)、营养琼脂(青岛市高科园海博生物技术有限公司)、MHB培养基(北京奥博星生物技术有限公司)、盐酸(烟台市双双化工有限公司)、氢氧化钠(天津市恒兴化学试剂制造有限公司)、小牛血清(浙江天杭生物科技有限公司)。氯甲酚纳米乳消毒剂按照文献[9]的方法制备。临用前利用蒸馏水稀释至所需浓度0.08%。3%吐温-80 PBS中和剂已由本课题组前期的中和剂筛选试验确定^[8],旨在消毒处理至预定时间时迅速终止残余消毒剂的继续作用,以确定体系中仍存活的微生物及其数量,从而判断该消毒剂的杀菌效果。

1.3 方法

1.3.1 消毒剂的使用浓度和作用时间

根据本课题组的前期试验结果^[8],氯甲酚纳米乳消毒剂的使用浓度为0.08%,作用时间分别为5、10、15 min。

1.3.2 各因素影响试验的分组

(1)有机物影响试验。以小牛血清为有机物代表,分别设无小牛血清组、含25%小牛血清组、含50%小牛血清组、阳性对照组、阴性对照组。

(2)温度影响试验。分别设 $(10\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 组、 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 组、 $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 组、阳性对照组、阴性对照组。

(3)pH影响试验。首先,利用酸度计测出0.08%氯甲酚纳米乳消毒剂的pH为6.67,然后分别设pH 4.64组、pH 6.67组、pH 8.68组、阳性对照组、阴性对照组。

1.3.3 各因素影响试验方法

各因素影响试验均采用悬液定量杀灭试验方法^[11],具体无菌操作方法如下:(1)试管中先加入0.5 mL菌悬液,再加入0.5 mL 3.0%牛血清白蛋白混匀,吸取消毒液4.0 mL注入其中,迅速混匀并立即计时。(2)当试验菌与消毒剂分别作用至5、10、15 min时,吸取0.5 mL试验菌与消毒剂的混合液与4.5 mL中和剂混匀,作用10 min后,再取出1 mL样液进行细菌培养计数。(3)试验重复3次,计

算每次试验的杀灭对数值和平均杀灭对数值。当细菌杀菌对数值 ≥ 5.00 时,判定为消毒合格。(4)同时,用标准硬水代替消毒液,进行平行试验,作为阳性对照组,以计数消毒作用前的活菌浓度。(5)将本次试验使用的中和剂、PBS稀释液、培养基分别设为阴性对照组,以进行无菌检查。

1.4 结果评价

依据《消毒技术规范》(2008版)的规定^[11],5、10、15 min均杀菌合格,则该因素无影响;5 min杀菌不合格,而10、15 min均杀菌合格,该因素有轻度影响;5、10 min均杀菌不合格,而15 min杀菌合格,该因素有中度影响;5、10、15 min均杀菌不合格,该因素有重度影响。

2 结果与分析

2.1 有机物对氯甲酚纳米乳消毒剂杀灭大肠杆菌效果的影响

由表1可知,氯甲酚纳米乳消毒剂分别作用5、10、15 min,三组平均杀菌对数值均大于5,均消毒合格,且细菌全部被杀死,消毒效果好。说明有机物对氯甲酚纳米乳消毒剂的杀菌效果无影响。

表1 有机物影响试验结果

组别	活菌数(CFU/mL)			平均杀菌对数值		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
无小牛血清	0	0	0	7.30	7.30	7.30
25%小牛血清	0	0	0	7.30	7.30	7.30
50%小牛血清	0	0	0	7.30	7.30	7.30

注:阴性对照组无细菌生长;阳性对照组的细菌数为 2×10^7 CFU/mL,细菌对数值为7.30,下同

2.2 温度对氯甲酚纳米乳消毒剂杀灭大肠杆菌效果的影响

由表2可知,在 $(10\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 和 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 组,消毒剂的杀菌效果均随着作用时间延长而增强,且在消毒5、10、15 min时,平均杀菌对数值均小于5,即均消毒不合格,说明 $(10\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 和 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 对该消毒剂的杀菌效果均有重度影响。在 $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$

表2 温度影响试验结果

组别	活菌数(CFU/mL)			平均杀菌对数值		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
$(10\pm 1)^{\circ}\text{C}$	2.80×10^4	7.90×10^3	1.75×10^3	2.85	3.40	4.06
$(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$	3.65×10^4	1.60×10^3	4.00×10^2	2.74	4.10	4.70
$(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$	0	0	0	7.30	7.30	7.30

组,消毒5、10、15 min时,平均杀菌对数值均大于5,均消毒合格,且细菌全部被杀灭,消毒效果好,说明 $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 对氯甲酚纳米乳消毒剂的杀菌效果无影响。结果表明,不同温度对氯甲酚纳米乳消毒剂的杀菌效果有不同影响。

2.3 pH对氯甲酚纳米乳消毒剂杀灭大肠杆菌效果的影响

由表3可知,在pH 4.64、6.67、8.68组,该消毒剂分别作用5、10、15 min,平均杀菌对数值均大于5,均消毒合格,且细菌全部被杀灭。说明pH对氯甲酚纳米乳消毒剂的杀菌效果无影响。

表3 pH影响试验结果

组别	活菌数(CFU/mL)			平均杀菌对数值		
	5 min	10 min	15 min	5 min	10 min	15 min
pH 4.64	0	0	0	7.30	7.30	7.30
pH 6.67	0	0	0	7.30	7.30	7.30
pH 8.68	0	0	0	7.30	7.30	7.30

3 结论与讨论

消毒剂的作用不仅取决于其本身的理化性质,而且受许多相关因素的影响,如病原微生物的类型、消毒药溶液的浓度和时间、温度、湿度、pH、有机物、水质硬度、联合应用等^[12]。

消毒环境中的粪、尿、饲料残渣、污血、炎性分泌物等有机物均可妨碍消毒剂与微生物的接触,并主要通过消毒剂中和、吸附或发生化学反应等方式影响消毒剂的杀菌作用。但各种消毒剂受有机物影响的程度是不同的。受有机物影响较大的消毒剂,在消毒前应先清扫或清洁待消毒环境和物品,以保证消毒效果。本试验结果表明,有机物对氯甲酚纳米乳消毒剂的杀菌效果无影响,但在临床实践中,为了提高消毒效果,建议将消毒对象预先进行清洁处理。

一般来说,消毒剂的杀菌效果与环境温度呈正相关,即温度越高,效果越好。但卤族元素消毒剂温度升高反而会降低消毒力,这是因为氯剂和碘剂有挥发作用导致的^[13]。本试验中,氯甲酚纳米乳消毒剂的杀菌效果随作用时间的延长而增强。当环境温度在 $(10\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 和 $(20\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 时,消毒不合格; $(30\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 时,消毒合格。表明温度对氯甲酚纳米乳消毒剂的杀菌效果有影响。为此,建议

当环境温度低于 30°C 时,可提高该消毒剂的浓度或延长作用时间以保证消毒效果。

pH也是影响消毒效果的一个重要因素,但它对各种消毒剂的影响情况不尽相同。酸碱性对无机含氯消毒剂消毒效果的影响较大,而对建立有排除酸碱性干扰功能的有机含氯消毒剂影响甚微^[14]。微生物最适合生长的pH范围为6~8,pH过高或过低对微生物的生长均有影响,从而影响消毒效果^[13]。本试验结果表明,pH对氯甲酚纳米乳消毒剂的杀菌效果无影响,说明该消毒剂在临床实践中的pH适用范围广。

参考文献:

- [1] 胡功政,邱银生.家禽常用药物及其合理使用[M].郑州:河南科学技术出版社,2010:27.
- [2] 胡功政,李荣誉.新全兽医手册[M].郑州:河南科学技术出版社,2015:31.
- [3] 李春雨,贺生中.动物药理[M].北京:中国农业大学出版社,2007:101.
- [4] Aremu I O, Badru O H, Oyemade O A. Comparative effectiveness of certain antimicrobial agents in semi solid preparations[J]. African Research Review, 2009, 3(4): 241-251.
- [5] Kempf M, Kimble R M, Cuttle L. Cytotoxicity testing of burn wound dressings, ointments and creams: A method using polycarbonate cell culture inserts on a cell culture system[J]. Burns, 2011, 37(6): 994-1000.
- [6] McDonnell G, Russell A D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2001, 12(1): 147-179.
- [7] Johnston D, Hanlon G W, Denyer S P, et al. Membrane damage to bacteria caused by single and combined biocides[J]. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94(6): 1015-1023.
- [8] Yang X F, Sun Y W, Mu S Y, et al. Evaluation of characterization and disinfection efficacy of chlorocresol nanoemulsion disinfectant[J]. RSC Advances, 2016, 6(16): 12730-12736.
- [9] 穆素雨,柳东阳,白渊哲,等.氯甲酚纳米乳消毒剂的消毒效果观察[J].中国兽医杂志,2016,52(5):35-37.
- [10] 杨雪峰,李任峰,任秀娟,等.一种氯甲酚纳米乳消毒剂及其制备方法.201510074247.2[P].2015-07-01.
- [11] 中华人民共和国卫生部.消毒技术规范[S].北京:中华人民共和国卫生部,2008:15-52.
- [12] 陈杖榴,曾振灵.兽医药理学(第4版)[M].北京:中国农业出版社,2017:301-303.
- [13] 李芳.消毒剂的影响因素和使用[J].中国畜牧兽医文摘,2017,33(2):223.
- [14] 邱豫伟,伍冀湘,皮镇江.酸碱性对含氯消毒剂消毒效果的影响[J].中华医院感染学杂志,2003,13(3):239-240.

(责任编辑:王丝语)