

谭凤霞,柴毅.季铵盐碘对气单胞菌的抑菌杀菌效果[J].江苏农业科学,2013,41(10):208-210.

# 季铵盐碘对气单胞菌的抑菌杀菌效果

谭凤霞,柴毅

(长江大学动物科学学院,湖北荆州 434025)

**摘要:**以气单胞菌属标准株 ATCC7966 和分离自养殖环境及患病鱼的气单胞菌为供试菌株,通过肉汤二倍稀释法研究季铵盐碘的抑菌杀菌效果。结果表明,季铵盐碘在低浓度时能抑制气单胞菌的生长增殖,高浓度杀灭细菌。季铵盐碘对 7 株气单胞菌的最小抑菌浓度(MIC)分别为 0.312 mL/L(ATCC7966、*Aeromonas* sp. T1、*Aeromonas* sp. T6)、0.625 mL/L(*Aeromonas* sp. T4、*Aeromonas* sp. T5)和 1.25 mL/L(*Aeromonas* sp. T2、*Aeromonas* sp. T3);其最小杀菌浓度(MBC)分别为 2.5 mL/L(ATCC7966、*Aeromonas* sp. T6)、5 mL/L(*Aeromonas* sp. T1、*Aeromonas* sp. T2、*Aeromonas* sp. T5)和 10 mL/L(*Aeromonas* sp. T3、*Aeromonas* sp. T4)。本研究结果能为季铵盐碘的合理使用提供一定的依据。

**关键词:**季铵盐碘;气单胞菌;最小抑菌浓度;最小杀菌浓度

**中图分类号:**S941.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)10-0208-03

气单胞菌属(*Aeromonas*)广泛分布于自然界,其中嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*A. caviae*)及温和气单胞菌(*A. sobria*)等已被确认是多种水产动物主要的病原菌,常给养殖生产带来较大经济损失<sup>[1]</sup>。季铵盐碘消毒剂是由季铵盐类化合物与碘络合而成,其中表面活性剂季铵盐能改变细胞膜通透性,破坏菌体酶系统,影响细菌新陈代谢,起到载体与助透作用<sup>[2]</sup>,且与碘络合后,性温和,稀释后碘和表面活性剂仍紧密结合,保证了碘的稳定性和杀菌性<sup>[3]</sup>。该消毒剂是一种复方消毒剂,能杀灭包括细菌、霉形体等在内的大部分病原微生物,且不受光、热、温度、有机物、pH 值以及水质的影响,可长期储存效力不减,对所消毒对象无腐蚀性和刺激性,目前已被畜禽、水产等养殖户广泛使用<sup>[4]</sup>。本试验以气

单胞菌 ATCC7966 作为标准株,以分离自患病鱼和水产养殖环境的气单胞菌作为供试菌株,研究季铵盐碘对气单胞菌的杀菌效果,为季铵盐碘在水产养殖上的合理使用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

季铵盐碘(季铵盐 40%,碘 10%);培养基为牛肉膏液体和固体培养基,pH 值 7.0±0.2;中和剂(5 g/L 硫代硫酸钠和 5 g/L 吐温-80)。试验所用其他试剂均为分析纯。

供试菌株为:气单胞菌标准菌株(*Aeromonas hydrophila*) ATCC7966 购自中国农业微生物保藏中心;气单胞菌(*Aeromonas* sp. T1、*Aeromonas* sp. T2)分离自患病鲫鱼<sup>[5]</sup>;气单胞菌(*Aeromonas* sp. T3、*Aeromonas* sp. T4、*Aeromonas* sp. T5、*Aeromonas* sp. T6)分离自养殖水环境<sup>[6]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌悬液的制备** 气单胞菌菌株用单倍肉汤经过增菌摇床过夜培养,取 24 h 新鲜培养物加甘油置于-80℃冰箱中保存备用。试验前 1 d 分别取出保存于-80℃冰箱中的菌株,接种于营养琼脂斜面,28℃培养 24 h 取出后,用胰蛋白胨

收稿日期:2013-04-09

基金项目:湖北省教育厅项目(编号:B20121210)。

作者简介:谭凤霞(1979—),女,山东潍坊人,博士,副教授,从事微生物学研究。E-mail:tanfengxia2008@163.com。

通信作者:柴毅,博士,副教授,从事生理学研究。E-mail:chaiyi123456@126.com。

[13] Holladay S D, Wolf J C, Smith S A, et al. Aural abscesses in wild-caught box turtles (*Terapene carolina*): possible role of organochlorine-induced hypovitaminosis A[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2001, 48(1): 99-106.

[14] Tangredi B P, Evans R H. Organochlorine pesticides associated with ocular, nasal, or otic infection in the eastern box turtle (*Terapene carolina carolina*) [J]. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 1997, 28(1): 97-100.

[15] McArthur S, Wilkinson R, Meyer J. Medicine and surgery of tortoises and turtles [M]. United Kingdom: Blackwell Publishing, 2004: 337-340.

[16] Mader D R. Reptile medicine and surgery [M]. Canada: Saunders Elsevier, 2006: 742-746.

[17] Joyner P H, Brown J D, Holladay S, et al. Characterization of the bacterial microflora of the tympanic cavity of eastern box turtles with and

without aural abscesses [J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2006, 42(4): 859-864.

[18] Sleeman J M, Brown J, Steffen D, et al. Relationships among aural abscesses, organochlorine compounds, and vitamin a in free-ranging eastern box turtles (*Terapene carolina carolina*) [J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2008, 44(4): 922-929.

[19] Brown J D, Richards J M, Robertson J, et al. Pathology of aural abscesses in free-living Eastern box turtles (*Terapene carolina carolina*) [J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2004, 40(4): 704-712.

[20] Piccolomini R, Cellini L, Allocati N, et al. Comparative in vitro activities of 13 antimicrobial agents against *Morganella-Proteus-Provencia* group bacteria from urinary tract infections [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1987, 31(10): 1644-1647.

[21] 宗志勇,吕晓菊.临床分离 87 株摩根摩根菌的体外抗菌药物敏感性研究[J].中国抗感染化疗杂志,2002,2(4):237-239.

生理盐水溶液 (TPS) 洗下菌苔,制成菌悬液,分别取各菌悬液与有机干扰物 (3% 牛血清白蛋白) 以 1 : 1 混合后制备成试验菌悬液备用。

1.2.2 季铵盐碘对气单胞菌的最小抑菌浓度 MIC 值测定  
用灭菌蒸馏水将季铵盐碘消毒剂稀释成体积分数分别为 0.156、0.312、0.625、1.25、2.5、5、10、20 mL/L 的受试液;依次将各稀释度受试液 2.5 mL 加入含 2.5 mL 双倍营养肉汤的试管中,则试管中季铵盐碘的浓度依次为 0.078、0.156、0.312、0.625、1.25、2.5、5、10 mL/L。每管接种 0.1 mL 含菌量约为 10<sup>8</sup> CFU/mL 的试验菌悬液,作为试验组。各菌悬液接种于不含季铵盐碘的营养肉汤中,作为阳性对照组;不接种细菌的营养肉汤管作为阴性对照。各组 28 ℃ 培养 24 h 后观察结果。当阳性对照组有细菌生长 (浑浊),阴性对照组无菌生长 (透明),试验组中无菌生长的最低季铵盐碘浓度即为季铵盐碘对该供试菌株的最小抑菌浓度 (MIC)。

1.2.3 季铵盐碘对气单胞菌的最小杀菌浓度 MBC 值测定  
在 MIC 测定试验的基础上进行 MBC 的测定,MIC 测定试验培养 24 h 后,观察结果,吸取试验组无菌生长的各个稀释度所对应的抗 (抑) 菌剂 0.5 mL,于含 4.5 mL 中和剂溶液管中,混匀,作用 10 min,吸取该最终样液 2.5 mL,加入到含 2.5 mL 双倍浓度营养肉汤的试管中,同时设立阳性对照组、阴性对照组、中和剂对照组。将试验组、阳性对照组、阴性对照组、中和剂对照组放置 28 ℃ 培养箱中,培养 24 h,观察结果。当阳性对照管有细菌生长 (浑浊),阴性对照管无菌生长 (透明),中

和剂对照管无菌生长 (透明),试验组无菌生长的最低季铵盐碘浓度即为季铵盐碘对该供试菌株的最小杀菌浓度 (MBC)。

2 结果与分析

2.1 季铵盐碘对气单胞菌的抑菌作用

各菌株在含有不同浓度的季铵盐碘的营养肉汤中培养 24 h 后观察季铵盐碘对各气单胞菌菌株的抑菌作用,结果见表 1。其中各阳性对照组试管表现为浑浊现象,表示各菌株细菌 24 h 内存活增殖,阴性对照各试管为透明现象,表示培养液无菌。含有季铵盐碘的各组试管表现为不同浓度下的透明或浑浊现象,其中 ATCC7966、*Aeromonas* sp. T1、*Aeromonas* sp. T6 菌株所在试管组在季铵盐碘浓度为 0.156 mL/L 及以下时,*Aeromonas* sp. T4、*Aeromonas* sp. T5 菌株所在试管组在季铵盐碘浓度为 0.312mL/L 及以下时,*Aeromonas* sp. T2、*Aeromonas* sp. T3 菌株所在试管在检验浓度为 0.625 mL/L 及以下浓度时各管表现为浑浊现象,表示此浓度的季铵盐碘未能抑制相应菌株细菌的生长;而 ATCC7966、*Aeromonas* sp. T1、*Aeromonas* sp. T6 菌株所在试管组在季铵盐碘浓度为 0.312 mL/L 及以上时,*Aeromonas* sp. T4、*Aeromonas* sp. T5 菌株所在试管组在季铵盐碘浓度为 0.625mL/L 及以上时,*Aeromonas* sp. T2、*Aeromonas* sp. T3 菌株所在试管在季铵盐碘浓度为 1.25 mL/L 及以上浓度时各管表现为透明现象,表示此浓度的季铵盐碘能抑制相应菌株细菌的生长,此浓度即为各相应菌株的最小抑菌浓度。

表 1 季铵盐碘对气单胞菌的抑菌作用

菌株	阳性对照	季铵盐碘浓度 (mL/L)								阴性对照
		0.078	0.156	0.312	0.625	1.25	2.5	5	10	
ATCC7966	+++	+++	--+	---	---	---	---	---	---	---
<i>Aeromonas</i> sp. T1	+++	+++	++	---	---	---	---	---	---	---
<i>Aeromonas</i> sp. T2	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---	---
<i>Aeromonas</i> sp. T3	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---	---	---
<i>Aeromonas</i> sp. T4	+++	+++	+++	-++	---	---	---	---	---	---
<i>Aeromonas</i> sp. T5	+++	+++	+++	--+	---	---	---	---	---	---
<i>Aeromonas</i> sp. T6	+++	+++	+++	---	---	---	---	---	---	---

注:“-”表示透明,“+”表示浑浊,其个数表示透明或浑浊的程度。

2.2 季铵盐碘对气单胞菌的杀菌作用

在季铵盐碘抑菌基础上,加入中和剂中和季铵盐碘的残留作用后在营养肉汤中继续培养 24 h 观察季铵盐碘对各气单胞菌菌株的杀菌作用,结果见表 2。其中各阳性对照组试管表现为浑浊现象,表示各菌株细菌 24 h 内存活增殖;阴性

对照各试管为透明现象,表示培养液无菌;中和剂对照组试管为透明现象,表示中和剂无菌;含有季铵盐碘的各组试管表现为不同浓度下的透明或浑浊现象,其中标准株 ATCC7966、*Aeromonas* sp. T6 在季铵盐碘浓度 1.25 mL/L 及以下时,而 *Aeromonas* sp. T1、*Aeromonas* sp. T2、*Aeromonas* sp. T5 则在季铵

表 2 季铵盐碘对气单胞菌的杀菌作用

菌株	阴性对照	中和剂对照	试验组 (季铵盐碘体积分数:mL/L)					阳性对照
			10	5	2.5	1.25	0.625	
ATCC7966	---	---	---	---	---	--+	+++	+++
<i>Aeromonas</i> sp. T1	---	---	---	---	-++	+++	+++	+++
<i>Aeromonas</i> sp. T2	---	---	---	---	-++	+++	+++	+++
<i>Aeromonas</i> sp. T3	---	---	---	--+	+++	+++	+++	+++
<i>Aeromonas</i> sp. T4	---	---	---	--+	+++	+++	+++	+++
<i>Aeromonas</i> sp. T5	---	---	---	---	-++	+++	+++	+++
<i>Aeromonas</i> sp. T6	---	---	---	---	---	-++	+++	+++

注同表 1。

盐碘浓度 2.5 mL/L 及以下时, *Aeromonas* sp. T3、*Aeromonas* sp. T4 在季铵盐碘浓度 5 mL/L 及以下时,各浓度组试管表现出浑浊现象,表示此浓度的季铵盐碘只是抑制了细菌的生长增殖,未能杀灭细菌,在季铵盐碘的残留作用被中和剂中和后,细菌重新开始生长增殖;而标准株 ATCC7966、*Aeromonas* sp. T6 在季铵盐碘浓度 2.5 mL/L 及以下时,而 *Aeromonas* sp. T1、*Aeromonas* sp. T2、*Aeromonas* sp. T5 则在季铵盐碘浓度 5 mL/L 及以下时, *Aeromonas* sp. T3、*Aeromonas* sp. T4 在季铵盐碘浓度 10 mL/L 时,各浓度组试管均表现为透明现象,表示此浓度下细菌已被杀灭,即使季铵盐碘的残留作用被中和剂中和后,细菌也无法重新生长增殖,此浓度即为各相应菌株的最小杀菌浓度。

2.3 季铵盐碘对气单胞菌的 MIC 和 MBC

根据季铵盐碘对气单胞菌的 MIC 及 MBC 的评判方法,抑菌试验中无菌生长的最高稀释度所对应的抑菌剂浓度,为该样品对受试菌的 MIC;杀菌试验中无菌生长的最高稀释度所对应的抗菌剂浓度,为该样品对受试菌的 MBC。季铵盐碘对各气单胞菌菌株的 MIC 值和 MBC 值结果见表 3。在本试验所设定的浓度梯度下,季铵盐碘对 7 株气单胞菌的最小抑菌浓度(MIC)分别为 0.312 mL/L (ATCC7966、*Aeromonas* sp. T1、*Aeromonas* sp. T6)、0.625 mL/L (*Aeromonas* sp. T4、*Aeromonas* sp. T5)和 1.25 mL/L (*Aeromonas* sp. T2、*Aeromonas* sp. T3);其最小杀菌浓度(MBC)分别为 2.5 mL/L (ATCC7966、*Aeromonas* sp. T6)、5 mL/L (*Aeromonas* sp. T1、*Aeromonas* sp. T2、*Aeromonas* sp. T5)和 10 mL/L (*Aeromonas* sp. T3、*Aeromonas* sp. T4)。

表 3 季铵盐碘对气单胞菌的 MIC 和 MBC		
菌株	MIC (mL/L)	MBC (mL/L)
ATCC7966	0.312	2.5
<i>Aeromonas</i> sp. T1	0.312	5
<i>Aeromonas</i> sp. T2	1.25	5
<i>Aeromonas</i> sp. T3	1.25	10
<i>Aeromonas</i> sp. T4	0.625	10
<i>Aeromonas</i> sp. T5	0.625	5
<i>Aeromonas</i> sp. T6	0.312	2.5

3 讨论

气单胞菌广泛存在于养殖水环境中,并且是主要的水生动物病原菌之一。季铵盐碘是水产养殖上常用的消毒剂之一,它是利用季铵盐碘络合上碘的产物,络合上的碘在水中能缓慢释放出碘,即保留了季铵盐灭菌效果好、无刺激、无腐蚀、无毒、无残留及长效等优点,也能弥补碘易挥发的缺点,使其杀菌范围更广<sup>[7]</sup>。王蕾等研究了市售的几种不同厂家生产的季铵盐络合碘的消毒效果,结果表明,不同厂家的产品所含季铵盐及碘的含量虽有所不同,但对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌杀灭率均大于 99.9%,对芽孢杆菌的杀灭率仅为 96% 左右,对新城疫病毒的杀灭效果与消毒剂中碘的含量有关<sup>[8]</sup>。双链季铵盐络合碘对刺参“腐皮综合征”的主要病原菌灿烂

弧菌 (*Vibrio splendidus*) 和假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas nigrifaciens*) 具有较好的杀灭效果。研究表明,双链季铵盐络合碘在 0.5 μL/L 时即可将假交替单胞菌全部杀灭,在 1 μL/L 时即可将灿烂弧菌全部杀灭,且随着消毒剂浓度的升高其杀灭细菌的时间也相应缩短<sup>[9]</sup>。张梁等采用二倍体稀释法测定季铵盐碘对温和气单胞菌的 MIC (体积分数) 是 0.004 82 mL/L, MBC (体积分数) 为 0.043 4 mL/L<sup>[10]</sup>。而本研究中,季铵盐碘对 7 株气单胞菌属细菌的 MIC (体积分数) 在 0.312 ~ 1.25 mL/L, MBC (体积分数) 在 2.5 ~ 10 mL/L 之间,均较张梁等的研究结果高。原因分析有二:一是,不同厂家生产的季铵盐碘中季铵盐和碘的含量不同。比如在王蕾等的研究中检验的季铵盐碘产品含量分别为:广东产品,含季铵盐 5%、碘 0.2%;山西产品,含季铵盐 5%、碘约 0.2%;河北产品,含季铵盐 5%、不含碘;齐鲁产季铵盐络合碘消毒剂,含季铵盐 5%、碘 1.5%<sup>[8]</sup>。本研究所用季铵盐碘消毒剂为含季铵盐 40%、碘 10%,但张梁等的研究未说明所用季铵盐碘中的产品含量。二是,不同的菌株对季铵盐碘的抗性不同。李军等研究发现猪源大肠杆菌 O157:H7 菌株对季铵盐碘消毒剂具有抗性<sup>[11]</sup>,本研究中也发现,7 株气单胞菌属细菌对季铵盐碘的 MIC 和 MBC 值有所不同,是由于菌株不同还是菌株本身产生了消毒剂抗性还有待进一步探讨。

本试验分别采用气单胞菌的标准株、自病鱼分离的菌株以及养殖环境分离的菌株为供试菌株,研究季铵盐碘作为一种水产养殖上常用的消毒剂的抑菌杀菌效果,这一结果可为季铵盐碘的合理使用提供一定的依据。

参考文献:

[1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报,1992,16(3):282-288.

[2] 王民权,房文红. 碘制剂在水产上的应用[J]. 渔业现代化,2005(2):26-27.

[3] 董菊红,李成应,谢 沅,等. 碘消毒剂应用现状[J]. 黑龙江畜牧兽医,2010(6):111-112.

[4] 鹿桂乾,张利萍,符若文. 新型季铵盐的杀菌活性研究[J]. 日用化学工业,2009,39(1):25-28.

[5] 谭凤霞,叶 聪. 基于 16S rDNA 序列的 2 株气单胞菌属细菌的分子鉴定[J]. 长江大学学报:自然科学版,2011,8(7):257-262.

[6] 谭凤霞. 基于 16S rDNA 序列的 4 株气单胞菌属细菌的分子鉴定[J]. 湖北农业科学,2012,51(9):1837-1843.

[7] 司秀芳. 水产消毒剂在养殖生产中的应用及发展趋势[J]. 渔业致富指南,2009(7):52-53.

[8] 王 蕾,李 玮,吴连勇,等. 双链季铵盐及季铵盐络合碘消毒剂消毒效果[J]. 中国兽药杂志,2003,37(4):42-44.

[9] 王友涛,王印庚,张国兵,等. 几种消毒剂对养殖刺参“腐皮综合征”主要致病菌杀灭试验的研究[J]. 海洋水产研究,2008,29(6):90-94.

[10] 张 梁,何 斌,殷 亮,等. 三种碘伏对温和气单胞菌的杀灭效果及安全性评价[J]. 河南水产,2004(1):26-28.

[11] 李 军,谢宇舟,冯世文,等. 猪源大肠杆菌 O157:H7 耐药表型和消毒剂抗性调查[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(2):203-206.