

钟纯燕,郝飞,李文良,等.不同消毒剂对规模化养羊场舍内空气细菌的影响[J].江苏农业科学,2019,47(8):194-197.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.08.045

不同消毒剂对规模化养羊场舍内空气细菌的影响

钟纯燕^{1,2},郝飞¹,李文良¹,毛立¹,主性²,嵇辛勤²,江杰元¹,李基棕¹,刘茂军¹

(1.江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室,江苏南京 210014;

2.贵州大学动物科学学院,贵州贵阳 550025)

摘要:为筛选出最佳消毒剂以降低羊舍内空气细菌含量,采用规模养羊场常用的 4 种消毒剂进行消毒效果试验,在消毒前后测定羊舍内空气中细菌总数,并对优势菌落进行 PCR 鉴定。结果显示,不同种类的消毒剂杀菌效果有差异,其中戊二醛溶液的杀菌率为 42.8%,戊二醛癸甲溴铵溶液杀菌率为 58.6%,溴氯海因杀菌率为 76.5%,聚维酮碘杀菌率为 44.5%,因此溴氯海因杀菌效果最佳;PCR 扩增测序结果表明,羊舍内空气细菌主要有芽孢杆菌、葡萄球菌、志贺氏菌、不动杆菌、奥斯特莫拉菌、希氏肠球菌和胚芽乳杆菌等,这些细菌的 16S rRNA 序列与 GenBank 收录的参考序列同源性达 98.0% 以上。本研究为规模养羊场细菌性疾病的预防与控制提供参考数据。

关键词:规模化养羊场;消毒剂;细菌计数;PCR 鉴定

中图分类号: S826.4⁺6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)08-0194-04

近年来,随着养羊业的不断发展,羊群数量不断增加,规模化养羊场逐渐形成。规模化养殖虽然降低了经济成本,但也因为患畜的频繁接触、羊舍通风不良、排泄物堆积等因素导致空气中细菌浓度大大升高,这对羊群健康产生潜在的威胁^[1-2]。王振对发病羊的病料进行细菌流行病学调查发现,主要病原菌有链球菌、葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、大肠杆菌和溶血性曼氏杆菌,动物试验结果显示这些细菌对小白鼠致病力较强^[3]。李奕芙研究得出,羊场发病死羊以绿脓杆菌的感染率最高(49.3%),且存在细菌多重感染,其中二重感染率达 54.4%^[4]。因此,掌握养羊场空气中的细菌数量和种类,是预防和控制养羊场细菌性疾病的先决条件。规模羊场常用喷雾消毒来杀灭羊舍内细菌,但市面上用于羊场细菌消毒的消毒剂种类较多,消毒效果也存在一定差异,选择敏感性消毒

剂做好环境消毒亦成为当前净化环境、控制疾病的主要手段^[5-6]。因此,为准确掌握各种消毒剂的杀菌效果,本试验采用喷雾消毒法对规模羊场常用的 4 种消毒剂进行消毒效果评估,计算消毒后的杀菌率,选择最有效合理的消毒剂,并鉴定其中的优势菌落,以期对消毒剂的选择提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 培养基及试剂 绵羊鲜血琼脂培养基购自杭州微生物试剂有限公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA marker 等均购自北京全氏金生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 消毒药品 试验使用了 4 种消毒剂,分别为稀戊二醛溶液、戊二醛癸甲溴铵溶液、溴氯海因粉和聚维酮碘溶液(表 1)。

1.2 试验时间与地点

本试验于 2017 年 11 月在江苏省太仓市某湖羊场进行。

1.3 采样设计

选择 4 间羊数、大小、风向相同的羊舍,在每间羊舍内设置 6 个细菌采集点,1 个采集点放置 2 个绵羊鲜血琼脂平皿,每间羊舍中间设有过道,分别在过道三等分处按图 1 所示设置 6 个采集点。

1.4 试验方法

1.4.1 空气中细菌总数测定 参照中华人民共和国国家标准 GB/T 18024.1—2000《公共场所空气微生物检验方法 细

感染的调查[J].中国兽医寄生虫病,1998,6(4):19-21.

[13]徐祥珍,孙凤华,曹汉钧,等.江苏省不同人群弓形虫感染调查[J].中国血吸虫病防治杂志,2006,18(6):468-469.

[14]李潭清,宋勤叶,杨润德,等.弓形虫病病原的实验诊断研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(36):15909-15911.

[15]王艳华,张德林,李学瑞,等.弓形虫病免疫学诊断方法研究进展[J].动物医学进展,2007(6):53-57.

[16]冯嘉轩,赵永坤,孟繁平,等.弓形虫病诊断方法研究进展[J].

传染病信息,2016,29(3):139-143.

[17]全国人体重要寄生虫病现状调查办公室.全国人体重要寄生虫病现状调查报告[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2005,23(增刊):332-340.

[18]卓国荣,狄和双,卢炜,等.不同检测方法分析泰州地区猫血清中弓形虫抗体[J].江苏农业科学,2013,41(10):190-191.

[19]李崎川,贾传礼.江苏省宿迁地区猫弓形虫流行病学调查和分析[J].畜牧兽医科学(电子版),2017(10):9-10.

表 1 4 种消毒剂详细信息

兽药名称	主要成分	用法	用量	生产厂家
稀戊二醛溶液	戊二醛	喷洒	配成 0.78% 溶液	镇江威特药业有限责任公司
戊二醛癸甲溴铵溶液	戊二醛和癸甲溴铵	喷洒	1 : (2 000 ~ 4 000) 稀释	广东养宝生物制药有限公司
溴氯海因粉	溴氯海因	喷洒	1 : 4 000	南京福润德动物药业有限公司
聚维酮碘溶液	碘	喷洒	配成 1% 溶液	山东亿鑫牧业有限公司

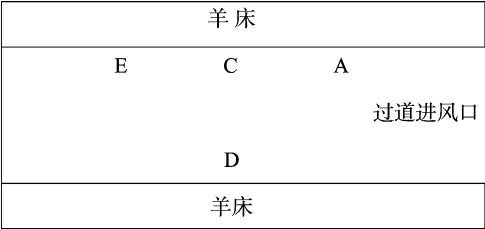


图1 羊舍测试点分布示意

菌总数测定》收集羊舍内空气中的细菌^[7]。消毒前后 1 h 对空气中的细菌进行收集,将绵羊鲜血琼脂平皿开盖放置于羊舍内离地面 1.5 m 的 6 个采集点上,暴露于空气中 10 min 后,盖好平皿盖,标注采集地点、日期及编号,冷藏快速送往实验室置于 37 ℃ 恒温培养箱过夜培养。对平皿上的细菌菌落进行计数,以每平皿菌落数(CFU/m³)报告结果。

1.4.2 消毒剂杀菌试验 将戊二醛溶液、戊二醛癸甲溴铵溶液、溴氯海因、聚维酮碘 4 种消毒剂按说明书上的最适杀菌浓度进行稀释,每种消毒液喷洒消毒 1 间羊舍,消毒后 1 h,利用自然沉降法收集羊舍内空气中的细菌,进行平板计数,计算消毒后的细菌含量和杀菌率^[8]。杀菌率=(消毒前菌数-消毒后菌数)/消毒前菌数×100%,从 6 个细菌采集点的杀菌率求

出每种消毒剂的平均杀菌率。

1.4.3 优势细菌鉴定 参照丁燕霞等设计的细菌 16S rRNA 引物^[9](P₁:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′;P₂:5′-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3′)进行 PCR 扩增,预期扩增片段大小约为 1 400 bp。选取优势菌落制备细菌染色体 DNA 模板,PCR 反应体系为 25.0 μL;Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,DNA 模板 2.0 μL,引物 P₁、P₂ 各 1.0 μL,10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTPs 1.0 μL,无菌水 17.0 μL。反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min 30 s,35 个循环;72 ℃ 10 min。反应结束后,取 PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳检测。将目的片段切胶回收,并与 pMD18-T 载体连接,转化 DH5α 感受态细胞,经鉴定正确后送南京金斯瑞生物科技有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 羊场舍内空气细菌菌落总数

羊舍内空气中采集到的细菌经过夜培养后,按奥氏公式^[10]计算菌落总数:C=50 000N/AT。C 表示菌落总数,CFU/m³;N 表示每皿菌落数,个;A 表示培养皿面积,cm²;T 表示采样时间,min。所得菌落总数见表 2。

表 2 羊舍内空气中的细菌菌落总数

羊舍编号	消毒剂种类	消毒状态	各采集点羊舍内空气中的细菌数(CFU/m ³)					
			A	B	C	D	E	F
1 号羊舍	戊二醛	消毒前	320	336	256	256	244	160
		消毒后	160	256	88	152	136	98
2 号羊舍	戊二醛癸甲溴铵	消毒前	680	360	880	720	840	640
		消毒后	256	204	320	280	368	223
3 号羊舍	溴氯海因	消毒前	304	640	560	560	600	480
		消毒后	100	52	84	200	101	156
4 号羊舍	聚维酮碘	消毒前	208	128	160	140	104	120
		消毒后	160	72	85	89	65	67

2.2 消毒剂杀菌试验

对 4 间羊舍分别使用 4 种消毒剂进行喷洒消毒,因消毒

剂的种类不同,消毒效果也不同,4 种消毒剂的杀菌率见表 3,其中以溴氯海因杀菌效果最好。

表 3 4 种消毒剂的杀菌率

消毒剂种类	杀菌率(%)						平均杀菌率
	A	B	C	D	E	F	
戊二醛	50.0	23.8	65.6	40.6	37.7	38.8	42.8
戊二醛癸甲溴铵	62.4	43.3	63.6	61.1	56.2	65.2	58.6
溴氯海因	67.1	91.9	85.0	64.3	83.2	67.5	76.5
聚维酮碘	23.1	43.8	72.5	46.9	36.4	44.2	44.5

2.3 优势细菌鉴定

2.3.1 PCR 鉴定结果 将 PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳,得到大小约 1 400 bp 的特异性条带,与预期结果一致(图 2)。测序获取核酸序列,BLAST 比对分析发现,主要优势菌包括芽孢杆菌属(枯草芽孢杆菌、地衣形芽孢杆菌、克劳氏

芽孢杆菌、土地芽孢杆菌和类芽孢杆菌)、葡萄球菌属(产色葡萄球菌、腐生葡萄球菌、溶血性葡萄球菌和金黄色葡萄球菌)、不动杆菌属(不动杆菌和鲁氏不动杆菌)、肠球菌(希氏肠球菌和屎肠球菌)、痢疾志贺氏菌、大肠杆菌、奥斯陆莫拉菌、胚芽乳杆菌等。

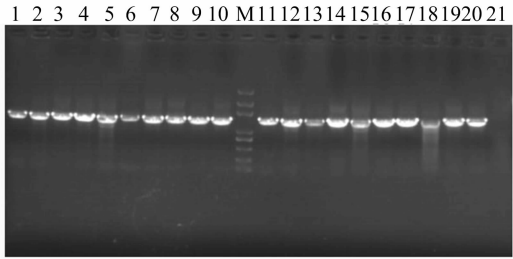


图2 羊舍空气中细菌 16S rRNA 的 PCR 扩增

2.3.2 遗传进化分析 将获取的核酸序列经 BLAST 比对分

析发现,痢疾志贺氏菌、奥斯陆莫拉菌、不动杆菌、屎肠球菌、胚芽乳杆菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌与 GenBank 中收录的菌株 16S rRNA 同源性均达 98% 以上。用 MEGA 5.0 绘制遗传进化树得出,金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、不动杆菌、胚芽乳杆菌和奥斯陆莫拉菌与 GenBank 中的参考序列遗传距离均较远;痢疾志贺氏菌与 HQ759185.1、KY789442、EU009185.1、KX162657.1 等 11 株菌序列亲缘关系最近;屎肠球菌与 KT261031.1、KT261082.1 亲缘关系最近;枯草芽孢杆菌与 CP024649、CP017682、AP018349.1、AP017891.1 亲缘关系最近,共同组成一组微小分支(图 3)。

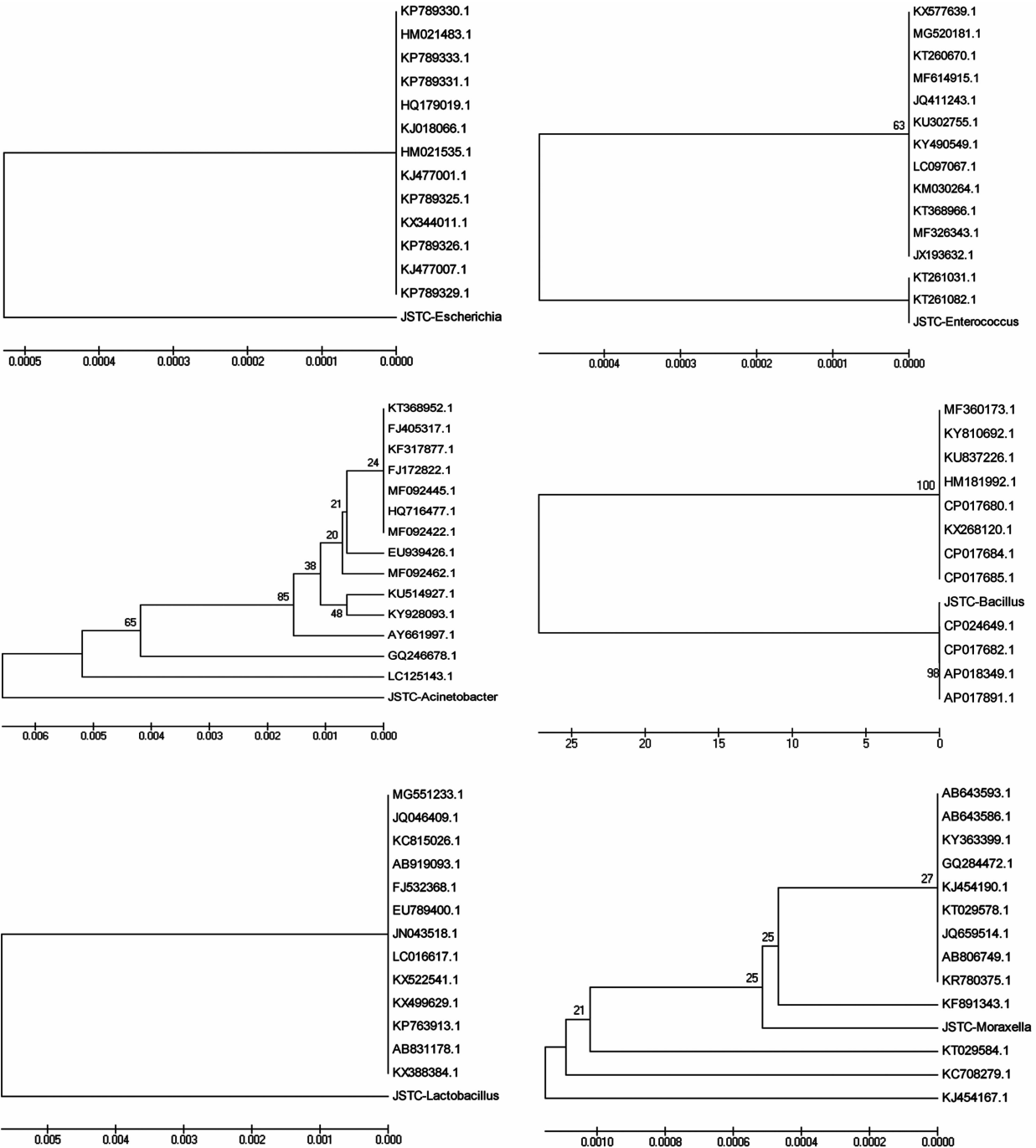


图3 8 种优势菌落 16S rRNA 的进化分析

3 讨论与结论

规模化养羊场疫病往往是在多种因素诱导下发生的,包括外界病原菌入侵或动物机体细菌增殖紊乱等因素造成^[11]。因此,对羊舍空气进行消毒是减少环境中的病原菌、消灭传染源、预防和控制羊群疾病的发生的重要措施。目前,消毒剂的种类繁多,消毒效果各异,在实际使用过程中存在选择不当造成效果不佳、疫病控制不力等问题。本试验对消毒剂杀菌能力进行比较分析,可筛选适用于规模化养羊场消毒使用的消毒剂。结果表明,通过测定消毒前后羊舍内空气细菌数量,4种消毒剂均有较好的消毒效果,其中溴氯海因杀菌效果最佳,杀菌率能达到76.5%,戊二醛癸二溴铵次之,杀菌率为58.6%,戊二醛杀菌率为42.8%,聚维酮碘消毒能力最弱,杀菌率为44.5%。卤素类消毒剂的杀菌效果具有广谱、高效、廉价等特点,是当前养殖生产中常用的消毒剂,其中氯的杀菌力最强,对皮肤和黏膜有刺激作用,广用于饮水消毒和厩舍、场地、车辆、排泄物等的消毒;碘杀菌能力稍弱,刺激性较小,一般用于皮肤消毒和创面消毒^[12-13]。本研究使用的溴氯海因溶于水后可形成次溴酸和次氯酸,推测混合型消毒剂的消毒效果较好;多重组分的消毒剂戊二醛癸二溴铵的杀菌效果也强于单一组分的消毒剂戊二醛。

空气中的致病菌可能通过微生物气溶胶的形式污染水槽或进入羊呼吸道引起感染,甚至污染羊场周围环境,威胁公共卫生安全^[14]。本试验通过对优势菌落进行PCR鉴定发现,该羊场存在一定数量的致病菌,其中痢疾志贺氏菌可感染幼羊导致腹泻,从而引起大批发病和死亡;金黄色葡萄球菌常引发渗出性皮炎、乳房炎、拉稀、关节肿大和脓肿等,说明兽医人员应制定健全的卫生管理制度,做好环境消毒和免疫接种^[15]。大肠杆菌是危害羊生产的常见条件致病菌,在临床检测中分离率较高,耐药性也较强^[16-17]。惠艳华等、陆桂平等和王磊等在上海、江苏和青海地区均检测到大肠杆菌病的发生^[18-20]。颜艾等对贵州省发病羊进行细菌检测发现,大肠杆菌感染率较高,且检出大肠杆菌和支原体混合感染^[21]。本试验羊场的空气中存在大肠杆菌,推测该细菌来源于羊群粪便和污水,因此羊场工作人员应加强粪便和污水的清理及无害化处理,防止大肠杆菌病的发生。本试验在羊舍空气中检测到枯草芽孢杆菌和尿肠球菌,近期研究表明这些细菌可作为日粮添加以提高动物的生长性能^[22-23],但其在羊舍空气中存在是否会对羊群健康造成影响,有待进一步探究。

以上结果表明,规模养羊场羊舍空气中细菌含量较高,种类繁多,且存在一些致病菌和条件致病菌。4种常见消毒剂杀菌效果均较好,其中以溴氯海因的消毒能力最佳,可在规模羊场推广应用。

参考文献:

- [1]王磊. 冬季舍饲密度对羊舍环境及肉羊生产性能影响的研究[D]. 石河子:石河子大学,2015.
- [2]Wilson - Welder J H, Nally J E, Alt D P, et al. Experimental

- transmission of bovine digital dermatitis to sheep; development of an infection model[J]. *Veterinary Pathology*, 2017(5): 1 - 13.
- [3]王振. 规模化羊场细菌病的流行病学调查及细菌性病原的分离鉴定和系统进化分析[D]. 泰安:山东农业大学,2015.
- [4]李奕芙. 规模化羊场细菌多重感染的病原分析与生物安全体系的实施[D]. 泰安:山东农业大学,2014.
- [5]Mitsui T, Harasawa R. The effects of essential oil, povidone - iodine, and chlorhexidine mouthwash on salivary nitrate/nitrite and nitrate - reducing bacteria[J]. *Journal of Oral Science*, 2017, 59(4): 597 - 601.
- [6]熊杨梅. 牛、羊场环境中气载需氧菌及金黄色葡萄球菌的检测与散播研究[D]. 晋中:山西农业大学,2016.
- [7]公共场所空气微生物检验方法 细菌总数测定:GB/T 18204.1—2000[S].
- [8]伍清林, 金兰梅, 张玉红, 等. 猪舍环境中细菌总数测定和消毒剂对致病菌的敏感性试验[J]. *金陵科技学院学报*, 2012, 28(4): 71 - 78.
- [9]丁燕霞. 市售鲜肉中细菌污染的安全评价和耐药性分析[D]. 长春:吉林大学,2015.
- [10]李基标, 高颖, 杜海燕, 等. 规模化养猪场环境细菌的调查与分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(8): 199 - 203.
- [11]Windsor P A. Paratuberculosis in sheep and goats[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 181(1/2, SI): 161 - 169.
- [12]刘春燕. 含氯消毒剂的研究进展[J]. *中国家禽*, 2004, 26(10): 51 - 52.
- [13]陈杖榴. 兽医药理学[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,2005.
- [14]唐芳, 高静, 靳玉舒, 等. 山西省某舍饲羊场环境微生物的检测与分析[C]. 中国畜牧兽医学会兽医病理学分会第二十一次学术研讨会暨中国病理生理学学会动物病理生理学专业委员会第二十次学术研讨会论文集, 2015.
- [15]李基标, 周碧君, 王开功, 等. 贵州省规模养猪场主要病原菌的耐药性检测[J]. *贵州农业科学*, 2011, 39(8): 132 - 135.
- [16]夏利宁, 向发, 罗小鱼, 等. 新疆某羊场分离的大肠杆菌对抗生素耐药性调查[J]. *新疆农业科学*, 2014, 51(1): 150 - 156.
- [17]Nielsen J N, Patterson J A. The presence and prevalence of salmonella, campylobacter spp and o - serotypes of *E. coli* in swine raised under differing management schemes[J]. *Letock Man*, 1996, 95(5): 143 - 148.
- [18]惠艳华, 叶慧萍, 付贵香. 一例羊大肠杆菌病的诊治[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2013(3): 63.
- [19]陆桂平, 王海燕. 一例羊大肠杆菌性腹泻的诊断和防控建议[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2014(2): 118 - 120.
- [20]王磊, 董海宏, 也志刚. 一起羊大肠杆菌病的诊治报告[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2017(4): 80.
- [21]颜艾, 王开功, 文明, 等. 羊场主要流行疫病调查[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(12): 191 - 194.
- [22]邓军, 李云锋, 杨倩. 枯草芽孢杆菌和猪源乳酸杆菌混合饲喂对仔猪肠绒毛发育的影响[J]. *畜禽业*, 2013, 44(6): 27.
- [23]文静, 孙建安, 周绪霞, 等. 尿肠球菌对仔猪生长性能、免疫和抗氧化功能的影响[J]. *浙江农业学报*, 2011, 23(1): 70 - 73.