

过硫酸氢钾复合物粉对4种常见水产病原微生物的杀灭效果

李声平^{1,2}, 董 靖¹, 杨移斌¹, 宋 悅³, 刘绍春⁴, 艾晓辉^{1,2}

1. 中国水产科学院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

3. 中国水产科学研究院, 北京 100039

4. 岳阳渔美康生物科技有限公司, 湖南 岳阳 414199

摘要: 为验证过硫酸氢钾复合物粉在水产养殖中消毒的有效性, 评价了其对草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 呼肠孤病毒 (Grass carp reovirus, GCRV)、斑点叉尾鮰 (*Ictalurus punctatus*) 病毒 (Channel catfish virus, CCV)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 和无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 4种水产常见致病病原的杀灭效果, 和有机物、温度、pH 3种因素对杀菌效果的影响, 并在此基础上开展了过硫酸氢钾复合物粉对池塘养殖水体中目标菌的杀灭试验, 和对患嗜水气单胞菌的病鲫 (*Carassius auratus*) 的药效试验。结果显示, 过硫酸氢钾复合物粉对4种致病微生物均具有显著的杀灭效果。降低菌悬液中有机物浓度、适当提高作用温度或适当降低消毒液pH, 均能促进过硫酸氢钾复合物粉消毒液的杀菌效果。通过目标菌的杀灭试验和药效试验, 进一步确定了该消毒剂在实际使用中对目标菌杀灭的有效性和对鲫感染嗜水气单胞菌后的显著治疗效果。研究表明, 过硫酸氢钾复合物粉是潜在的水产用消毒剂。

关键词: 过硫酸氢钾复合物粉; 消毒; 病毒灭活; 杀菌效果

中图分类号: R 187

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Killing effect of compound peroxymonosulphate powder on four common aquatic pathogens

LI Shengping^{1,2}, DONG Jing¹, YANG Yibin¹, SONG Yi³, LIU Shaochun⁴, AI Xiaohui^{1,2}

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

2. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

3. Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100039, China

4. Yueyang Yumeikang Biotechnology Co., Ltd., Yueyang 414199, China

Abstract: To study the disinfection validity of compound peroxymonosulfate powder in aquaculture, we evaluated its killing effect on grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) reovirus (GCRV), channel catfish (*Ictalurus punctatus*) virus (CCV), *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus agalactiae*, and studied the germicidal effects of three factors (Organic matter, temperature and pH). Moreover, we conducted a killing assay of the target bacteria in pond aquaculture water and a pharmacodynamic test of crucian carp (*Carassius auratus*) with *A. hydrophila* disease. The results show that the compound peroxymonosulfate powder had a significant killing effect on the four pathogens. Reducing organic matter concentration in bacterial suspension, appropriately increasing temperature or decreasing pH of disinfectant could promote the germicidal effect. In addition, through the

收稿日期: 2023-03-22; 修回日期: 2023-04-13

基金项目: 现代农业产业技术体系专项基金 (CARS-46); 2022年芙蓉计划省企业创新创业团队“渔美康水产养殖绿色投入品科技创新创业团队”; 国家自然科学基金青年科学基金项目 (31702368)

作者简介: 李声平 (1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产药理学。E-mail: lsp19970906@163.com

通信作者: 艾晓辉 (1968—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为水产药理学。E-mail: aixh@yfi.ac.cn

killing assay of target bacteria and pharmacodynamic test of crucian carp, we further confirmed the disinfectant validity on target bacteria and significant therapeutic effect of crucian carp infected with *A. hydrophila*. Thus, the study indicates that compound peroxyomonosulfate powder can be used as a potential disinfectant in aquaculture.

Keywords: Compound peroxyomonosulfate powder; Disinfection; Virus inactivation; Germicidal effect

水产品持续受到消费者的青睐,促进了水产行业的快速发展。但在养殖过程中,各种水产动物疾病接踵而来,给养殖户带来巨大困扰^[1]。如今,水产动物疾病依旧以预防为主,消毒是主要的预防措施^[2]。然而,消毒剂在水产养殖中的使用尚缺乏科学指导,相关研究甚少,导致消毒剂的滥用,给养殖环境带来新的危机。因此亟需研发水产养殖新消毒剂,并为其实际应用提供参考。过硫酸氢钾复合物粉是以过硫酸氢钾复合盐为主,辅以有机酸、无机酸、表面活性剂等组合而成的一种新型的过氧化物类消毒剂,其水溶液具有极强的杀灭病原微生物能力,且毒副作用小^[3-4]。已有研究发现,过硫酸氢钾复合物粉对多种细菌和病毒均具有杀灭效果^[5-7],但该消毒剂对水产常见致病微生物的杀灭效果鲜有报道。

近年来,对全球暴发的几百种水产动物疾病事件分析显示,细菌和病毒是引起水产动物疾病的主要病原^[8-9]。呼肠孤病毒(Grass carp reovirus, GCRV)是引起草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)产生严重出血症状的主要病毒株,属水生呼肠孤病毒属(*Aquareovirus*),对青鱼(*Mylopharyngodon piceus*)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)和稀有𬶋鲫(*Gobio-cypris rarus*)均具有很强的致病性^[10]。斑点叉尾鮰病毒(Channel catfish virus, CCV)是斑点叉尾鮰(*Ictalurus punctatus*)极度敏感的一种致病性病毒,感染后会产生明显的异常症状甚至死亡^[11]。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)能造成鱼类皮肤溃烂,引发出血性败血症^[12];有研究者从患出血病的大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)^[13]和罗非鱼(*Oreochromis spp.*)鱼苗阶段暴发病^[14]中分离鉴定出嗜水气单胞菌,给我国水产业造成了巨大经济损失。罗非鱼对链球菌(*Streptococcaceae*)非常敏感,极易被感染而发病,且无乳链球菌(*S. agalactiae*)为主要易感菌株,已对我国的罗非鱼养殖造成严重威胁^[15-16]。因此,本研究在实验室条件下评价了过硫酸氢钾复合物粉消毒剂对呼肠孤病毒、斑点叉尾鮰病毒、嗜水气单胞菌和无乳链球菌4种水产常见致病微生物的杀灭效果,并在此基础上进一步探究了该消毒剂在养殖水体中的使用效果,以确定

其在实际使用中的有效性和合理使用方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

呼肠孤病毒由中国水产科学院长江水产研究所范玉顶研究员赠送;斑点叉尾鮰病毒由华中农业大学袁军法副教授赠送;草鱼肾细胞(*Ctenopharyngodon idellus* kidney, CIK)、斑点叉尾鮰卵巢细胞(Channel catfish ovary cells, CCO)、嗜水气单胞菌XS-91-4-1和无乳链球菌ATCC51487均由本实验室保存;过硫酸氢钾复合物粉有效氯质量分数不低于10%,由湖南裕翔生物科技有限公司提供;RS培养基购自青岛海博生物技术有限公司;科玛嘉B族链球菌显色培养基购自上海欣中生物工程有限公司。

1.2 病毒灭活试验

1.2.1 细胞培养与病毒滴度测定

草鱼肾细胞、斑点叉尾鮰卵巢细胞采用分别含10%(体积分数)胎牛血清和1%(体积分数)双抗的M199培养基和DMEM培养基于28℃培养。当细胞数培养至 5×10^6 个·mL⁻¹时,进行胰酶消化,消化后的细胞用相应培养基稀释成 5×10^5 个·mL⁻¹接种于96孔板,每孔接种100μL,并置于28℃培养过夜。呼肠孤病毒、斑点叉尾鮰病毒分别采用无血清的相应培养基进行10倍系列稀释,分别接种于含草鱼肾细胞或斑点叉尾鮰卵巢细胞的96孔板中,每个稀释度接种4孔,于28℃培养,每天采用光学显微镜观察细胞出现病变孔数,做好标记,连续观察7d。通过计算半数细胞感染量(TCID₅₀)来表示病毒感染滴度。

1.2.2 中和剂的鉴定试验

试验根据2002版《消毒技术规范》方法进行中和剂鉴定。中和剂选用质量分数为0.5%硫代硫酸钠溶液,过硫酸氢钾复合物粉消毒液选择试验最低稀释度1:400。试验分为两步:第一步为鉴定中和剂、消毒剂和中和产物对细胞生长的影响,共分为4组,第1组为5mL中和剂+细胞;第2组为(0.5mL消毒剂+4.5mL中和剂)+细胞;第3组

为 5 mL 消毒剂+细胞；第 4 组为细胞正常培养。试验观察 7 d。第二步为正式试验（表 1），共分为 6 组，采用 1.2.1 的方法测定正式试验中各组的病毒量 (TCID₅₀)，结果评判标准为：1) 第 1 组无病毒或少量病毒；2) 第 2 与第 1 组病毒量相近或稍多，但显著少于第 3、第 4 和第 5 组；3) 第 3、第 4 和第 5 组病毒数量与原接种量接近；4) 第 6 组细胞正常生长。

表1 正式试验
Table 1 Formal test

组别 Group	类目 Category
1	(0.45 mL 消毒剂+0.05 mL 病毒悬液)+4.5 mL 无菌水
2	(0.45 mL 消毒剂+0.05 mL 病毒悬液)+4.5 mL 中和剂
3	(0.45 mL 无菌水+0.05 mL 病毒悬液)+4.5 mL 中和剂
4	(0.45 mL 消毒剂+4.5 mL 中和剂)+0.05 mL 病毒悬液
5	4.95 mL 无菌水+0.05 mL 病毒悬液
6	细胞正常培养

1.2.3 病毒灭活试验

试验测定不同稀释度消毒液在不同作用时间下对病毒的灭活效果。将 0.9 mL 待测消毒液与 0.1 mL 病毒悬液作用至规定时间 (5、10、20、30 min)，取出 0.1 mL 反应液，立即加入到 0.9 mL 中和剂中吹打均匀，作用 10 min，将混合液进行 TCID₅₀ 滴度测定。阳性对照组采用 0.1 mL 病毒悬液加入 0.9 mL 无血清培养基中混合均匀，取 0.1 mL 反应液加入到 0.9 mL 中和剂中作用 10 min，随后进行病毒滴度测定。病毒灭活率计算方法：设阳性对照组病毒滴度为 N₀，试验组为 N_x，病毒灭活率 = (N₀-N_x)/N₀×100%。

1.3 杀菌试验

1.3.1 中和剂的鉴定

试验选取嗜水气单胞菌和无乳链球菌作为供试菌株，试验温度为 (20±1) °C。试验采用悬液定量杀菌的方法进行，消毒液采用试验最低稀释度 1:400，中和剂选用 0.5% (质量分数) 硫代硫酸钠溶液，消毒液与菌株作用时间设为 5 min。试验分为 6 组（表 2），结果评判标准为：1) 第 1 组无菌或有少量菌生长；2) 第 2 与第 1 组细菌量接近或稍多，但显著少于第 3、第 4 和第 5 组；3) 第 3、第 4 和第 5 组间细菌数量误差率≤15%；4) 第 6 组无

表2 中和剂鉴定的组别
Table 2 Groups of neutralizer identification

组别 Group	类目 Category
1	(0.45 mL 消毒剂+0.05 mL 菌悬液)+4.5 mL PBS
2	(0.45 mL 消毒剂+0.05 mL 菌悬液)+4.5 mL 中和剂
3	(0.45 mL PBS+0.05 mL 菌悬液)+4.5 mL 中和剂
4	(0.45 mL 消毒剂+4.5 mL 中和剂)+0.05 mL 菌悬液
5	4.95 mL PBS+0.05 mL 菌悬液
6	中和剂+PBS

细菌生长。由此表明所选中和剂为适宜^[17]。

1.3.2 定性杀菌

活化的菌体用 PBS 稀释成 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ CFU·mL⁻¹。取 10 支试管排放在试管架上，每管加无菌蒸馏水 2.5 mL，于第 1 管加入稀释度为 1:200 的过硫酸氢钾复合物粉消毒液 2.5 mL，混匀后，从第 1 管取 2.5 mL 至第 2 管，以此类推至第 9 管，取 2.5 mL 弃去，第 10 管不加消毒液作为阳性对照组。每管加入稀释的菌悬液 2.5 mL，于 20 °C 水浴中分别作用至规定时间，从每管中取 0.5 mL 混合液加入 4.5 mL 中和剂中和 10 min，随后取 0.5 mL 反应液加入 4.5 mL 液体培养基中，于适宜温度下培养。每天观察培养基状况，以培养基出现混浊代表有菌生长，若未见混浊，继续观察至第 7 天，若仍不混浊方可代表无菌生长。结果评判：以试管中无菌生长的最低消毒液浓度为该作用时间下最低杀菌有效浓度，以该试管中无菌生长的最短时间为该浓度杀菌最快有效时间。

1.3.3 定量杀菌

活化菌体用 PBS 稀释成 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ CFU·mL⁻¹。取 0.5 mL 菌悬液分别加入不同稀释度消毒液 4.5 mL 中，于 20 °C 水浴中作用至规定时间，随后取 0.1 mL 反应液加入 0.9 mL 中和剂中和 10 min，分别取 0.2 mL 混合液接种于琼脂平板进行活菌计数。以 PBS 代替消毒液，进行上述步骤，作为对照组。结果判定：杀菌率 = (对照组活菌数 - 消毒后活菌数)/对照组活菌数 × 100%。

1.4 各种因素对杀菌效果的影响

1.4.1 有机物对杀菌效果的影响

试验采用悬液定量杀菌的方法进行。选用无菌胎牛血清作为有机物，分别稀释成体积分数为 0%、10%、25% 和 50% 有机物的菌悬液，并与相

同稀释度消毒液作用。比较不同浓度有机物存在下, 作用不同时间的杀菌率。

1.4.2 温度对杀菌效果的影响

试验采用悬液定量杀菌的方法进行。将菌悬液与相同稀释度消毒液分别在5、15、25和35℃条件下作用不同时间, 比较杀菌率。

1.4.3 pH对杀菌效果的影响

选择合适消毒液稀释度, 测定消毒液pH。制备 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液和硫酸溶液, 用于调节消毒液pH。设消毒液pH为X, 则分别调节消毒液pH至X-2、X+2。采用悬液定量杀菌的方法测定消毒液在X-2、X、X+2的pH下作用不同时间的杀菌率。

1.5 目标病原菌杀灭试验

试验将15 d内未进行任何消毒处理的池塘养殖水以每箱20 L添加至4个水族箱。养殖水预先进行目标菌计数, 随后将实验室活化目标菌用PBS稀释成特定浓度菌悬液加入到养殖水, 使养殖水菌液终浓度为 $10^5\sim10^6\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。提前进行预试验, 确定推荐实际使用消毒液稀释度。设立低、中、高($1:80\,000$ 、 $1:160\,000$ 、 $1:320\,000$)3个推荐消毒液稀释度组, 并设立加菌液不加消毒液组作为阴性对照组。试验采用悬液定量杀菌方法进行, 试验水温为 $(25\pm2)\text{ }^\circ\text{C}$, 嗜水气单胞菌采用RS培养基进行计数, 无乳链球菌采用科玛嘉B族链球菌显色培养基进行计数。

1.6 药效试验

水产养殖用消毒液以泼洒或药浴方式施于养殖水体后, 可能具有治疗水产动物疾病的功效。本试验选用鲫(*Carassius auratus*)为试验对象, 选择无病无伤的鲫75尾, 体质量为 $(200\pm20)\text{ g}$, 以药浴方式给药。试验在5个100 L水族缸中进行, 设立3个消毒剂治疗组($1:80\,000$ 、 $1:160\,000$ 、 $1:320\,000$)、阳性和阴性对照组, 每组15尾。试验前, 鲫在水族缸中提前暂养7 d, 随后对阳性对照组和3个消毒剂处理组的鲫分别腹腔注射 0.2 mL 质量浓度为 $1.5\times10^8\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的嗜水气单胞菌悬液, 阴性对照组注射相同剂量的PBS。感染6 h后, 分别向消毒剂处理组的养殖水体中施加过硫酸氢钾复合物粉消毒液, 使3个消毒剂处理组养殖水体中消毒液的终稀释度分别为 $1:80\,000$ 、 $1:160\,000$ 和 $1:320\,000$ 。每隔24 h重新施加消毒

液, 施加前每组换水30%, 连续施加3次。阴性对照组以相同间隔施加最低试验稀释度消毒液($1:80\,000$)。连续观察7 d, 每天记录各组鲫的死亡数量。

1.7 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件作图, 实验数据以“平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)”表示。采用t检验分析两组间数据差异的显著性, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 病毒灭活试验

2.1.1 中和剂的选择

如图1-a—1-h所示, 各处理组细胞生长状况与对照组相当, 可见中和剂、中和产物和消毒剂对细胞无不良影响; 正式试验结果(表3)结合1.2.2中结果评判标准分析显示, 以0.5% (质量分数)硫代硫酸钠溶液作为中和剂能有效中和过硫酸氢钾复合物粉消毒液的残留作用。由此判定所选中和剂为合格。

2.1.2 病毒灭活结果

如图2-a所示, 稀释度为 $1:800$ 的过硫酸氢钾复合物粉消毒液与呼肠孤病毒作用30 min, 可使呼肠孤病毒完全灭活; 当该消毒液稀释度为 $1:1\,600$ 及以上时, 与呼肠孤病毒作用至30 min, 仍未见病毒有灭活效果。斑点叉尾鮰病毒与稀释度为 $1:800$ 的过硫酸氢钾复合物粉消毒液作用10 min, 可使病毒完全灭活; 当该消毒液稀释度为 $1:1\,000$ 及以上时, 作用至30 min, 仍未完全灭活病毒(图2-b)。

2.2 杀菌试验

2.2.1 中和剂的选择

结合表4与1.3.1中结果评判标准可知, 0.5% (质量分数)硫代硫酸钠溶液能有效中和过硫酸氢钾复合物粉消毒液的残留作用, 且中和剂和中和产物对两种细菌的正常生长无影响。由此判定所选中和剂为适宜。

2.2.2 定性杀菌结果

由表5可知, 过硫酸氢钾复合物粉消毒液与嗜水气单胞菌、无乳链球菌分别作用5和10 min, 所需的最低杀菌有效浓度均为400倍稀释。当作用时间延长至30 min时, 过硫酸氢钾复合物粉消毒液对嗜水气单胞菌、无乳链球菌的最低杀菌有效浓

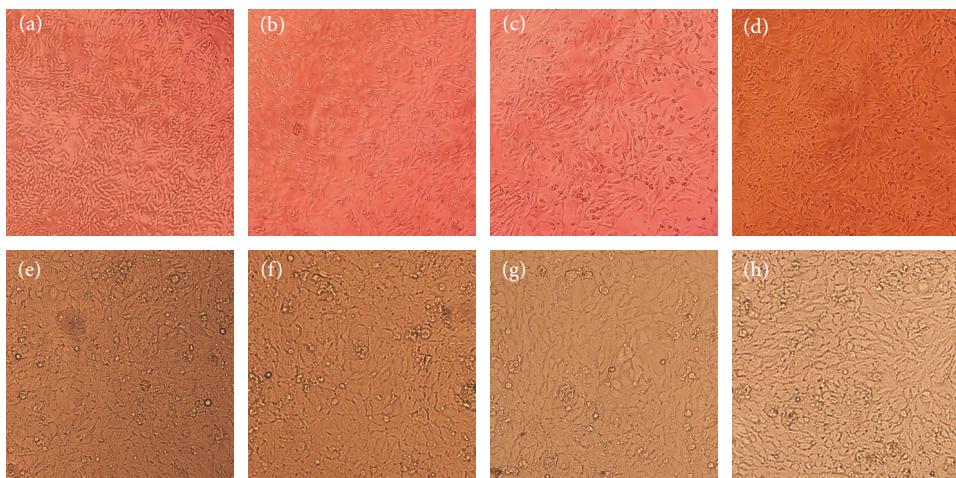


图1 中和剂、中和产物和消毒剂对细胞生长的影响

注: a. 草鱼肾细胞, 正常组; b. 草鱼肾细胞, 中和剂组; c. 草鱼肾细胞, 中和产物组; d. 草鱼肾细胞, 消毒剂组; e. 斑点叉尾鮰卵巢细胞, 正常组; f. 斑点叉尾鮰卵巢细胞, 中和组; g. 斑点叉尾鮰卵巢细胞, 中和产物组; h. 斑点叉尾鮰卵巢细胞, 消毒剂组。

Fig. 1 Effects of neutralizer, neutralization products and disinfectant on cell growth

Note: a. CIK, normal group; b. CIK, neutralizer group; c. CIK, neutralization product group; d. CIK, disinfectant group; e. CCO, normal group; f. CCO, neutralizer group; g. CCO, neutralization product group; h. CCO, disinfectant group.

表3 病毒灭活试验的中和剂鉴定结果

Table 3 Neutralizer identification results of virus inactivation assay

组别 Group	TCID ₅₀ 对数值 lg	
	呼肠孤病毒 GCRV	斑点叉尾鮰病毒 CCV
1	1.11±0.16	0
2	1.44±0.08	0
3	4.41±0.13	4.50±0.22
4	4.50±0.22	4.39±0.08
5	4.41±0.13	4.59±0.13
6	0	0

注: 该表组别与表1对应。

Note: The groups in this table correspond to the groups in Table 1.

度分别降低至800倍和1600倍稀释。

2.2.3 悬液定量杀菌结果

试验前采用平板活菌计数法测出嗜水气单胞菌悬液的原始细菌数为 $(8.22\pm0.44)\times10^6$ CFU·mL⁻¹, 无乳链球菌悬液的为 $(2.10\pm0.31)\times10^6$ CFU·mL⁻¹。如图3-a所示, 当过硫酸氢钾复合物粉消毒液稀释度不高于1:8000时, 作用10 min可完全杀灭嗜水气单胞菌; 当稀释度提高至1:30000时, 延长作用至30 min仍未完全杀灭嗜水气单胞菌。过硫酸氢钾复合物粉消毒液对无乳链球菌杀灭效果显示(图3-b), 当该消毒液在稀释度不高于1:15000时, 作用5 min即可达到100%杀灭率; 当稀释度达1:80000时, 作用至30 min仍未达到完全杀

灭。因此, 可通过提高该消毒液稀释度和延长作用时间来提高对两株细菌的杀灭效果。

2.3 影响因素对杀菌效果的影响

2.3.1 有机物对杀菌效果的影响

如图4-a所示, 稀释度为1:10000的过硫酸氢钾复合物粉消毒液与未添加有机物的嗜水气单胞菌悬液作用10 min可达到100%杀灭率; 当菌悬液中有机物的体积分数达50%, 在规定作用时间内杀灭率均不显著($P>0.05$)。未添加有机物的无乳链球菌悬液与稀释度为1:20000的过硫酸氢钾复合物粉消毒液作用20 min, 可达到100%杀灭率(图4-b); 然而, 当菌悬液中添加了无机物, 在规定作用时间内, 无乳链球菌均未完全杀灭。综上, 菌悬液中有机物的存在会降低过硫酸氢钾复合物粉消毒液的杀菌效果。

2.3.2 温度对杀菌效果的影响

在35 °C作用条件下, 稀释度为1:10000的过硫酸氢钾复合物粉消毒液作用5 min, 可完全杀灭嗜水气单胞菌(图5-a); 而随着作用温度的降低(25、15、5 °C), 达到完全杀灭嗜水气单胞菌所需的作用时间逐渐延长(10、20、30 min)。温度对过硫酸氢钾复合物粉消毒液(1:80000)杀灭无乳链球菌的影响效果显示(图5-b), 当作用温度由35 °C下降至5 °C时, 作用30 min对无乳链球菌的杀灭率由 $(93.54\pm4.37)\%$ 下降至 $(19.45\pm9.17)\%$ 。因此, 可通过适当提高作用温度促进过硫酸氢钾复合物粉消毒液的杀菌效果。

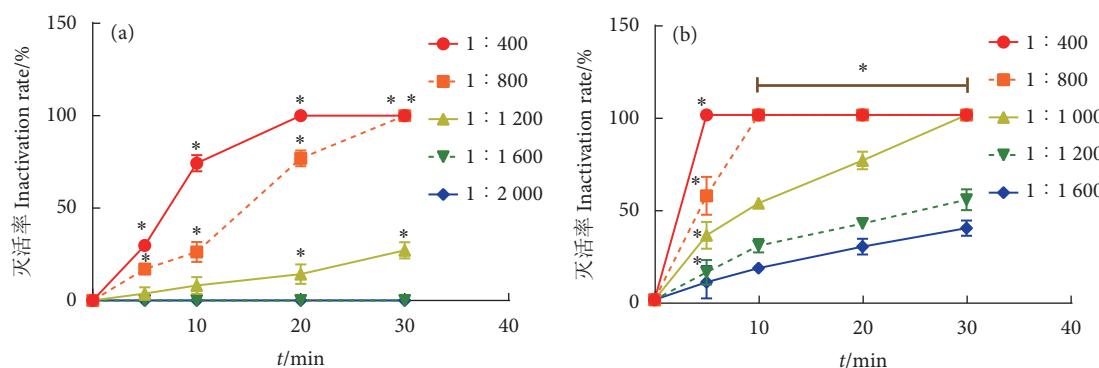


图2 过硫酸氢钾复合物粉对呼肠孤病毒和斑点叉尾鮰病毒的灭活结果

注: a. 呼肠孤病毒; b. 斑点叉尾鮰病毒; 与消毒前原始病毒滴度相比, *. P<0.01。

Fig. 2 Inactivation results of GCRV and CCV by compound peroxyomonosulphate powder

Note: a. GCRV; b. CCV; when compared with the original virus titer before disinfection, *. P<0.01.

表4 用于杀菌试验的中和剂鉴定结果

Table 4 Neutralizer identification results of bactericidal assay

组别 Group	嗜水气单胞菌质量浓度 Mass concentration of <i>A. hydrophila</i> / (CFU·mL ⁻¹)	无乳链球菌质量浓度 Mass concentration of <i>S. agalactiae</i> / (CFU·mL ⁻¹)
1	0	0
2	(3.5±0.82)×10 ⁵	58±18
3	(3.15±0.72)×10 ⁶	(2.27±0.31)×10 ⁶
4	(2.68±0.26)×10 ⁶	(2.33±0.38)×10 ⁶
5	(2.85±0.33)×10 ⁶	(2.03±0.20)×10 ⁶
6	0	0

注: 该表组别与表2对应。

Note: The groups in this table correspond to the groups in Table 2.

2.3.3 pH 对杀菌效果的影响

嗜水气单胞菌采用稀释度为1:10 000的过硫酸氢钾复合物粉消毒液, 无乳链球菌采用稀释度为1:20 000的消毒液。如图6-a所示, 与该消毒液在pH为6.8、8.8条件下达到完全杀灭嗜水气单胞菌所需的作用时间相比(10 min), pH为4.8条件下达到完全杀灭仅需5 min。无乳链球菌与pH为5.2的该消毒液作用20 min可达到完全杀灭(图6-b); 而相同作用时间, pH在7.2、9.2条件下未完全杀灭。结果表明, 适当降低过硫酸氢钾复合

物粉消毒液的pH, 可提高其杀菌效果。

2.4 养殖水体中目标菌的杀灭效果

试验研究了推荐使用的低、中、高稀释度(1:80 000、1:160 000、1:320 000)过硫酸氢钾复合物粉消毒液对池塘养殖水中目标菌的直接杀灭效果。由图7-a可知, 本实验室目标菌株在养殖水中能稳定存活, 其细菌数在各作用时间内无显著性差异($P>0.05$)。如图7-b—7-c所示, 低稀释度消毒液(1:80 000)与嗜水气单胞菌和无乳链球菌分别作用60 min, 均能达到100%的杀灭率, 相比之下, 高稀释度消毒液(1:320 000)作用60 min, 杀灭率明显降低。与消毒前的细菌数相比, 两种菌株除了与高稀释度消毒液作用10 min时杀菌不显著外($P>0.05$), 均具有极显著的杀菌效果($P<0.01$)。

2.5 过硫酸氢钾复合物粉对鮰感染嗜水气单胞菌的保护作用

杀菌试验结果表明, 过硫酸氢钾复合物粉消毒液对嗜水气单胞菌具有显著的体外杀灭效果。因此, 推测该消毒剂可能通过鳃等组织器官进入水产动物体内, 从而具有体内治疗效果^[18]。如图8所示, 在试验期间, 阴性对照组鮰未发生死亡, 而阳性对照组和消毒剂处理组鮰在第2天开始出现死亡。在第7天, 阳性对照组鮰的成活率仅为13.33%,

表5 过硫酸氢钾复合物粉定性杀菌试验
Table 5 Qualitative suspension test of compound peroxyomonosulphate powder

菌种 Bacteria	最低杀菌有效稀释度 Minimal bactericidal effective concentration				
	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	1:400	1:400	1:800	1:800	1:3 200
无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	1:400	1:400	1:800	1:1 600	1:3 200

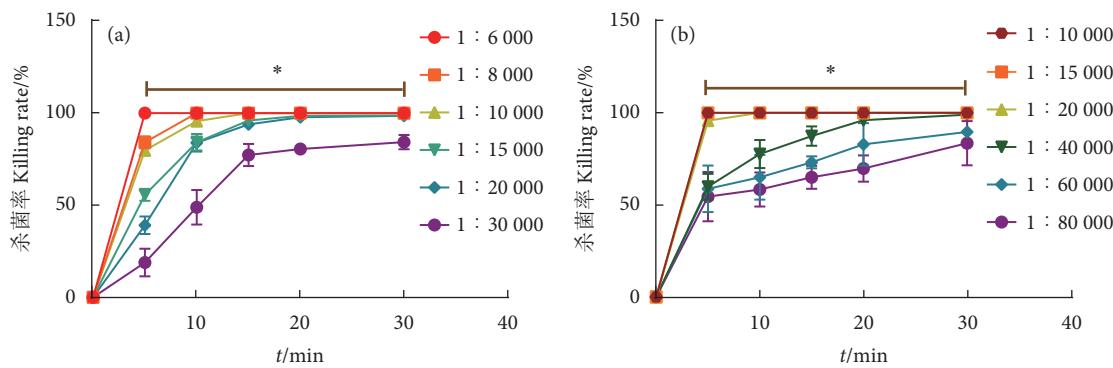


图3 悬液定量杀菌结果

注: a. 嗜水气单胞菌; b. 无乳链球菌; 与消毒前原始细菌数相比, *. P<0.01; 图6 同此。

Fig. 3 Quantitative germicidal results of suspension

Note: a. *A. hydrophila*; b. *S. agalactiae*; when compared with the original number of bacteria before disinfection, *. P<0.01. The same case in Fig. 6.

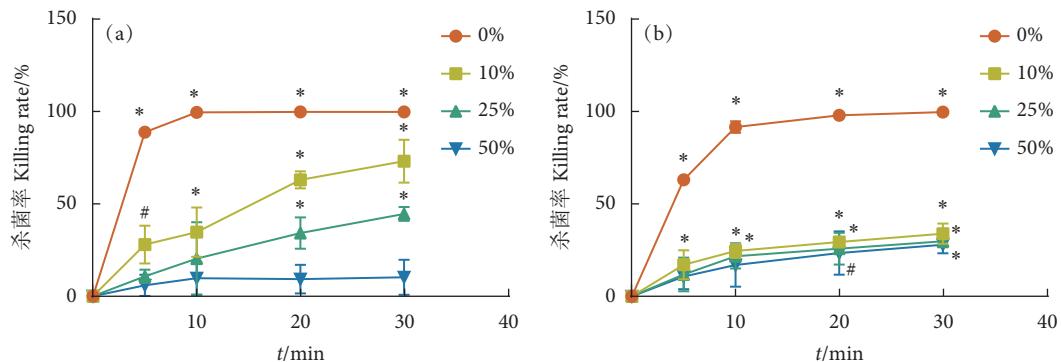


图4 有机物浓度对过硫酸氢钾复合物粉杀菌效果的影响

注: 0%、10%、25% 和 50% 分别代表有机物在菌悬液中的体积分数; a. 嗜水气单胞菌; b. 无乳链球菌;
与消毒前原始细菌数相比, *. P<0.01; #. 0.01<P<0.05; 图5 同此。

Fig. 4 Germicidal effect of organic matter concentration on compound peroxyomonosulphate powder

Note: 0%, 10%, 25% and 50% represent the volume fractions of organic matter in the bacterial suspension, respectively; a. *A. hydrophila*; b. *S. agalactiae*; when compared with the original number of bacteria before disinfection, *. P<0.01; #. 0.01<P<0.05. The same case in Fig. 5.

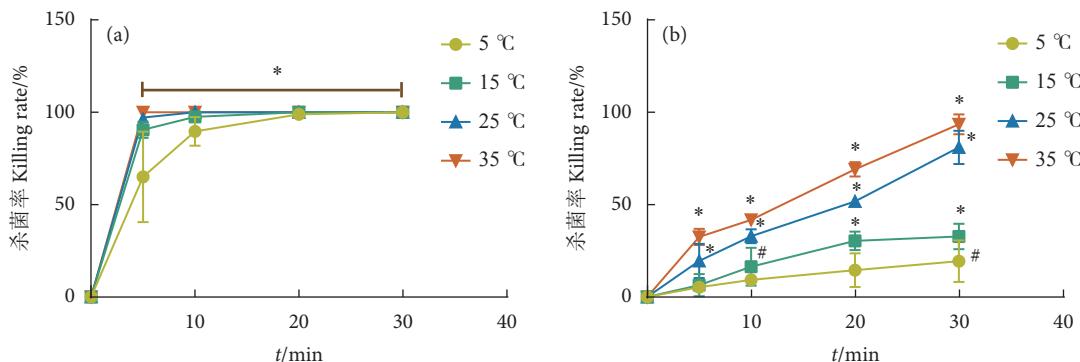


图5 温度对过硫酸氢钾复合物粉杀菌效果的影响

Fig. 5 Germicidal effect of temperature on compound peroxyomonosulphate powder

而各消毒剂治疗组 (1:80 000、1:160 000、1:320 000) 的成活率分别为 86.67%、66.67%、40.00%。结果表明, 感染嗜水气单胞菌的鲫在过硫酸氢钾复合物粉消毒液稀释度为 1:80 000、1:160 000 和 1:320 000 的药浴条件下均具有显著的体内治疗效果 ($P<0.05$)。

3 讨论

过硫酸氢钾复合物粉作为一种新型的过氧化物消毒剂, 已被发现对病毒、细菌均有显著的杀灭效果^[19]。周淑棉等^[20]发现过硫酸氢钾复合盐稀释 200 倍后, 与伪狂犬病毒 (*Pseudorabies virus*) 作用

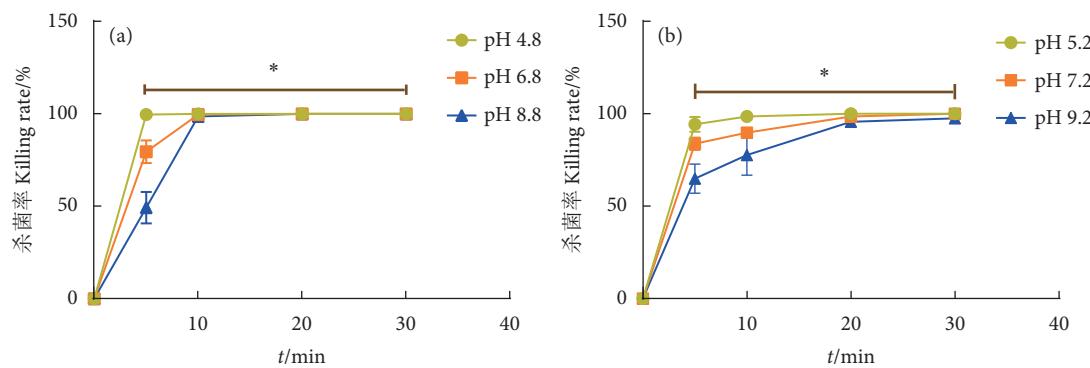


图6 pH对过硫酸氢钾复合物粉杀菌效果的影响

Fig. 6 Germicidal effect of pH on compound peroxyomonosulphate powder

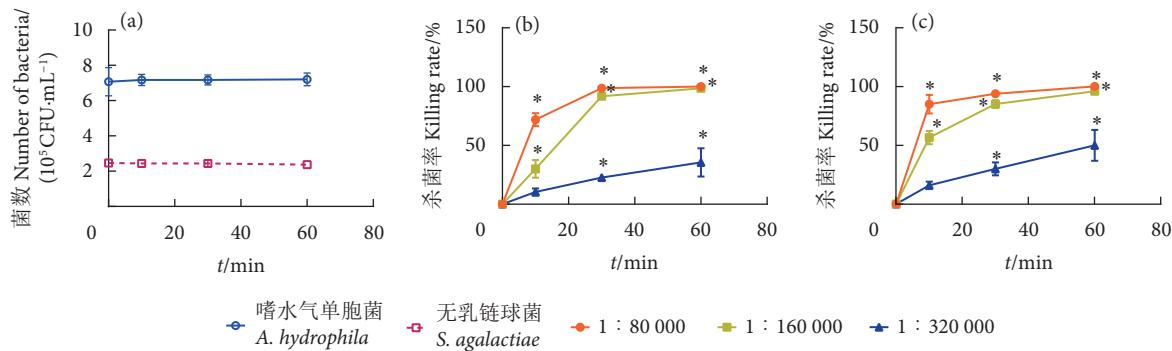


图7 养殖水中目标菌的杀灭效果

注: a. 阴性对照组; b. 嗜水气单胞菌; c. 无乳链球菌; 与消毒前原始细菌数相比, *. P <0.01。

Fig. 7 Killing effect of target bacteria in aquaculture water

Note: a. Negative control group; b. *A. hydrophila*; c. *S. agalactiae*; when compared with the original number of bacteria before disinfection, *. P <0.01.

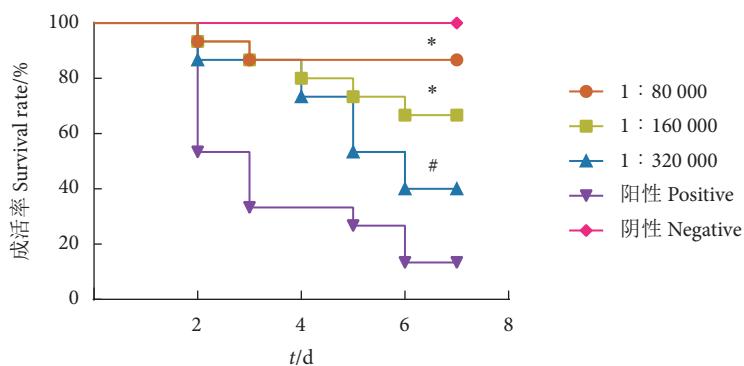


图8 过硫酸氢钾复合物粉提高卿感染嗜水气单胞菌后的成活率

注: 与阳性对照组成活率相比, *. P <0.01; #. 0.01 < P <0.05。

Fig. 8 Increased survival rate of *C. auratus* infected with *A. hydrophila* after treatment of compound peroxyomonosulphate powder

Note: When compared with the survival rate of the positive control group, *. P <0.01; #. 0.01 < P <0.05.

60 min 及以上时能达到完全灭活。秦涛等^[21]报道过硫酸氢钾复合物粉稀释 500 倍后, 与 H7N9 亚型流感病毒作用 10 min 及以上时, 可使病毒完全灭活。杨绒娟等^[22]研究指出过硫酸氢钾复合物粉消毒液与马腺疫链球菌兽疫亚种 (*S. equi* subsp. *zooepidemicus*) 和多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*) 分别作用 5 min, 达到完全杀灭所需的稀释度分别

为 1:1600 和 1:3200。然而, 关于该消毒剂对水产常见致病微生物的研究尚少。因此, 本文探究了过硫酸氢钾复合物粉消毒液对水产常见致病微生物的杀灭效果。结果显示, 该消毒剂对斑点叉尾鮰病毒、呼肠孤病毒、嗜水气单胞菌和无乳链球菌均具有显著的杀灭效果。消毒剂作为化合物, 参与反应时常会受到一些干扰因素的影响^[23]。已有研究发

现消毒产品如臭氧(O_3)、二氧化氯(ClO_2)在消毒时均会受到温度、pH等因素的影响^[24-25]。因此,研究各因素对过硫酸氢钾复合物粉杀菌效果的影响对该消毒剂的指导使用至关重要。

消毒剂的实际使用不能仅参考在实验室控制条件下的研究结果,自然养殖水体的其他细菌、有机物等的存在均会影响消毒效果。王成桂等^[26]研究指出消毒剂应用于养殖海水中杀菌时,其细菌数呈现先下降后上升的趋势,显示养殖水中具有大量促进细菌生长的营养物质。陈璇^[27]研究显示聚维酮碘在双蒸水中对嗜水气单胞菌的有效杀菌浓度比在养殖水中低20倍。为此,本研究开展了过硫酸氢钾复合物粉消毒剂对养殖水体中目标菌的杀灭效果试验。结果显示,推荐的低、中、高3个稀释度消毒液(1:80 000、1:160 000、1:320 000)均能达到显著的杀灭效果,呈剂量依赖性,但未见目标菌有先下降后上升的趋势,这可能由本研究设置的作用时间过短所致。

嗜水气单胞菌是一种广泛存在于水环境中的条件致病菌,是引起鱼类暴发性出血病和鱼类败血症的主要致病菌,已成为鱼类疾病防治中面临突出问题^[28-29]。抗生素的使用是水产养殖户治疗细菌性疾病的主要措施,但容易导致耐药菌的出现,使其使用受到限制^[30]。目前,关于各种中草药提取物的抗水产致病菌的研究备受关注,这些研究旨在实现不抑制细菌生长的前提下减少该细菌致病性,如染料木素、柚皮苷和血根碱均显示具有减少嗜水气单胞菌毒力和治愈感染嗜水气单胞菌的鱼类的效果^[31-33]。然而,这些中草药提取物的给药方式主要是以灌胃或注射的方式进行,需要养殖户较大的工作量和技术支持,限制了其应用。消毒剂除了有体外杀灭微生物的作用外,可能还具有治疗疾病的效果。郭远^[34]报道猪口服聚维酮碘溶液能杀灭猪肠道内的致病微生物,具有治疗猪胃肠炎的功效。陈超然等^[35]研究发现当二氧化氯药液施加于养殖水体后,对患有水霉病的泥鳅(*Misgurnus anguillinaudatus*)有显著的治疗作用。本研究发现,过硫酸氢钾复合物粉消毒液在推荐使用的稀释度(1:80 000、1:160 000、1:320 000)作用下,不但具有杀灭养殖水体中目标菌的作用,还具有显著治愈患嗜水气单胞菌病鱼的效果,且给药方式以实际泼洒后的药浴方式即可,较好地解决了养殖户给

药的困扰,但其具体的作用机制还有待进一步研究。综上,过硫酸氢钾复合物粉是一款具有体外显著杀灭微生物和体内显著治疗作用的潜在水产用消毒剂。

参考文献:

- 王玉堂,赵宏.养殖鱼类疾病的预防措施探析[J].中国水产,2020(7): 29-32.
- 张甫赛,丁德明.稻田综合种养的水产动物病害防控[J].湖南农业,2021(12): 28.
- ANIPSITAKIS G P, TUFANO T P, DIONYSIOU D D. Chemical and microbial decontamination of pool water using activated potassium peroxyomonosulfate[J]. Water Res, 2008, 42(12): 2899-2910.
- 唐兴刚,魏文康,罗胜军,等.过硫酸氢钾复合物在畜牧水产中的应用研究进展[J].中国兽药杂志,2020, 54(8): 73-79.
- 冯秀,王爱玲,张振仓,等.过硫酸氢钾复合物最佳杀菌条件的研究[J].动物医学进展,2017, 38(8): 39-42.
- 乔莉萍,黄银君,薛飞群,等.过硫酸氢钾复合物粉对口蹄疫病毒杀灭效果试验[J].湖北农业科学,2013, 52(8): 1877-1879.
- 王娟,卞国志,袁建丰,等.过硫酸氢钾复合盐对鸡新城疫病毒杀灭效果观察[J].中国消毒学杂志,2018, 35(8): 563-565.
- FEIST S W, THRUSH M A, DUNN P, et al. The aquatic animal pandemic crisis[J]. Rev Sci Tech, 2019, 38(2): 437-457.
- 赵明军,张洪玉,周状.中草药对水产动物疾病防治的药效学研究综述[J].安徽农业科学,2009, 37(36): 8010-8015, 8036.
- HE L B, ZHANG A D, PEI Y Y, et al. Differences in responses of grass carp to different types of grass carp reovirus (GCRV) and the mechanism of hemorrhage revealed by transcriptome sequencing[J]. BMC Genomics, 2017, 18(1): 452.
- OURTH D D, MARECAUX E, RAGHU D, et al. Innate immune response of channel catfish *Ictalurus punctatus* mannose-binding lectin to channel catfish virus (CCV)[J]. Dis Aquat Organ, 2017, 124(2): 159-163.
- WANG R X, HU X C, LÜ A J, et al. Transcriptome analysis in the skin of *Carassius auratus* challenged with *Aeromonas hydrophila* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2019, 94: 510-516.
- 雷坤,谢业扬,马远雄,等.稻田养殖的大鳞副泥鳅出血病病原菌的分离鉴定与药敏试验[J].淡水渔业,2019, 49(6): 70-74.
- 程儒仿,李杨,蔡为民.三氯异氰尿酸对罗非鱼鱼苗培育阶段暴发病的防病效果研究[J].淡水渔业,2014, 44(2): 94-96.
- ZHANG D F, LI A H, GUO Y J, et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* in diseased farmed tilapia in China[J]. Aquaculture, 2013, 412/413: 64-69.
- WANG K Y, CHEN D F, HUANG L Y, et al. Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in China[J]. Afr J Microbiol Res, 2013, 7(4): 317-323.
- FU W X, ZHANG K Y, ZHANG L F, et al. Study on germicidal efficacy of the compound peroxymonosulphate powder[J]. Chin

- Veter Sci, 2011, 41(10): 1070-1075.
- [18] LORENZEN E, BRUDESETH B E, WIKLUND T, et al. Immersion exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry to wildtype *Flavobacterium psychrophilum* induces no mortality, but protects against later intraperitoneal challenge[J]. Fish Shellfish Immunol, 2010, 28(3): 440-444.
- [19] SORAWOT S, SAKCHAI R, KAZUAKI T. Bactericidal and virucidal efficacies of potassium monopersulfate and its application for inactivating avian influenza virus on virus-spiked clothes[J]. J Vet Med Sci, 2018, 80(4): 568-573.
- [20] 周淑棉, 陶富平, 张伟超, 等. 过硫酸氢钾复合盐消毒剂, 温度和紫外线对伪狂犬病毒灭活效果研究 [J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(2): 111-119.
- [21] 秦涛, 汪川韦, 石宝兰, 等. 4种常用消毒剂对H7N9亚型流感病毒灭活效果研究 [J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(8): 64-68.
- [22] 杨绒娟, 李朋朋, 周德刚. 过硫酸氢钾复合物粉对不同菌株的消毒效果研究 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(14): 85-87.
- [23] RUSSELL A D. Factors influencing the activity of antimicrobial agents: an appraisal[J]. Microbios, 1974, 10(38): 151-174.
- [24] 王芳, 刘育京. 有机物、酸碱度、温度对臭氧水杀菌效果影响的研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2000, 10(5): 338-340.
- [25] 何文杰, 张甜甜, 李荣光, 等. 二氧化氯消毒效果影响因素试验研究 [J]. 供水技术, 2011, 5(3): 19-22.
- [26] 王成桂, 李旋, 杨世平, 等. 6种消毒剂对养殖海水中细菌的杀灭效果 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(16): 152-154, 161.
- [27] 陈璇. 嗜水气单胞菌感染前后黄鳝脾脏转录组分析及聚维酮碘对其杀菌效果的测定 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2018: 49.
- [28] SARDER H, PUNOM N J, KHAN T, et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas hydrophila* isolated from freshwater fishes[J]. J Fish, 2016, 4(3): 411-419.
- [29] LIU X D, SUN W, ZHANG Y B, et al. Impact of *Aeromonas hydrophila* and infectious spleen and kidney necrosis virus infections on susceptibility and host immune response in Chinese perch (*Siniperca chuatsi*)[J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 105(4): 117-125.
- [30] CHEN J L, HUANG L L, WANG Q, et al. Antibiotics in aquaculture ponds from Guilin, South of China: occurrence, distribution, and health risk assessment[J]. Environ Res, 2022, 204: 112084.
- [31] DONG J, ZHANG D F, LI J R, et al. Genistein Inhibits the Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* by disrupting quorum sensing mediated biofilm formation and aerolysin production[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 753581.
- [32] RAMANATHAN S, RAMA D K, SIVASUBRAMANIAN S, et al. Anti-quorum sensing and protective efficacies of naringin against *Aeromonas hydrophila* infection in *Danio rerio*[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 600622.
- [33] ZHANG L S, MA L, YANG Q H, et al. Sanguinarine protects channel catfish against *Aeromonas hydrophila* infection by inhibiting aerolysin and biofilm formation[J]. Pathogens, 2022, 11(3): 323.
- [34] 郭远. 防治生猪腹泻药物调查报告(一)——“安多福”产品经济有效 [J]. 中国动物保健, 2012, 14(12): 23-25.
- [35] 陈超然, 孟长明, 陈昌福. 用稳定性粉状二氧化氯防治鱼类水霉病的实验研究 [J]. 中国水产, 2017(10): 73-75.