



最终研究报告

研究课题

普境安和各种竞争产品在潮湿条件下
对金黄色葡萄球菌的抗菌活性检测 2

数据需求

研究和开发

作者

Jennifer Dunham, B. S.

最终研究报告完成于

04. 21. 2015

执行试验室

MicroChem Laboratory, Inc.
1107-C S. Airport Circle
Euless, TX 76040

试验室项目认证编号

050405-1, 050412-2

入档

这份报告的原始档案被记录在试验室笔记 NMC 的第 146 页 1-12 和 52-66。这份
笔记、协议和最终研究报告都存储在 MicroChem Laboratory, Inc. 的档案中

委托方

Archangel L. L. C.
636 Hampshire St.
Quincy, IL 62301

(备注：此文件仅为中文翻译文件，签名请参考英文原文)

摘要

研究课题

普境安和各种竞争产品在潮湿条件下对金黄色葡萄球菌的抗菌活性检测 2

MicroChem Laboratory 项目认证编号

050405-1, 050412-2

普境安和各种竞争产品被用于为动物圈舍清洁和除臭，如畜棚或畜栏这些动物可能居住的地方。在不同的饲养阶段，这些动物圈舍可能铺有潮湿的稻草或干草，由于尿液或其他环境因素影响，这些可能会导致动物居住环境不卫生。此项研究检测了潮湿条件下普境安和各种竞争产品的抗菌活性。

为了模拟潮湿的稻草，将 2×2 厘米的方格纸剪开、消毒、用金黄色葡萄球菌标记，并在无菌的培养皿中放置三张方格纸，立即在一组方格纸上撒上每种产品，另一组方格纸作为对照，不加处理。不同的环境温度，不同的接触时间，每个培养皿中有三张方格纸，以检测金黄色葡萄球菌存活的数量（CFU）。检测的是减少百分比和抑制百分比。该试验中的湿度与产品使用环境相似。对普境安（On Gurad）、一种新的竞争产品和四种旧的竞争产品进行了检测。

在室温下，竞争产品 24 小时内杀死了 0%，并抑制了 0-95.73%的金黄色葡萄球菌。

试验结果显示普境安在室温下，24 小时内杀死 92.25%-99.45%，抑制 99.97%-99.9996%的金黄色葡萄球菌。普境安比其他竞争产品至少多杀死了 80%、多抑制了 4%的金黄色葡萄球菌。普境安的抗菌活性比 Staldren、Barn Fresh、Mistral、Stable Boy 和 Sweet PDZ 几种产品都要强。

研究课题

普境安和各种竞争产品在潮湿条件下对金黄色葡萄球菌的抗菌活性检测 2

MicroChem Laboratory 项目认证编号

050405-1, 050412-2

目的

本试验的目的是通过模拟在金黄色葡萄球菌感染的畜棚/动物圈舍中发现的潮湿稻草，检测普境安和各种竞争产品在潮湿条件下的抗菌活性。

材料

普境安

使用剂量: 1 lb/100ft²

检测浓度: 0.383g/培养皿

Midstates Stalosan, Inc.

Quincy, IL

竞争产品:

Sweet PDZ

使用剂量: 5-6 cups/144ft²

检测浓度: 0.798g/培养皿

RockPointe Corporate Center

Spokane, Washington

Poultry Litter Treatment (PLT)

使用剂量: 75lbs/1000²

Jones-Hamilton Company

Walbridge, OH

EnviroShield

使用剂量: 50g/m²

R&D Distribution

Marshalltown, IA

Staldren

使用剂量: 50g/m²
检测浓度: 0.393g/培养皿
Trading Company LDL
Spinnerstraat 36
7461 TT Rijssen
Holland

Stable Boy

使用剂量: 2kg/9m²
检测浓度: 1.74g/培养皿
Westhawk Traders Ltd.
Vancouver, B. C.

Barn Fresh

使用剂量: 18kg/45m²
检测浓度: 3.14g/培养皿
Western Industrial Clay Products LTD.
Kamloops, B. C.

Mistral

使用剂量: 100g/m²
检测浓度: 0.785g/培养皿
Mistral Olmix
LeLintan 56580 Brehan
France

金黄色葡萄球菌 ATCC# 6538

American Type Culture Collection
Manassas, VA 20110

营养液体培养基 (NB)

生产批号 4223326, 保质期 7/09
Difco Laboratories
Detroit, MI

营养琼脂 (NA)

生产批号 4237960, 保质期 1/09
Difco Laboratories

Dey Engley 液体培养基 (DE)

生产批号 4362309, 保质期 9/07
Difco Laboratories

甘氨酸

生产批号 02613CB, 保质期 6/06
Aldrich Chemical Company

Milwaukee, WI

消毒去离子水 (SDIW)

MicroChem Laboratory, Inc.
Euless, TX

培养皿, 塑料, 一次性 15x100mm

Fox Scientific
Alvarado, TX

恒温器 35±2°C

蒸汽灭菌器, STM-E 模型

Market Forge

试管架、不锈钢瓶塞、18×150mm 试管

1ml、10ml 吸量管, 玻璃, 无菌

VWR Scientific
Sugarland, TX

镍铬合金线圈

Baxter Diagnostic, Inc.
McGraw Park, IL

黑色记号笔

剪刀

涡流振荡器

Fisher Scientific

工作用纸

金属镊子

盐瓶

步骤

1. 细菌培养

用于该试验的菌株来自美国典型培养物保藏中心。将保存好的金黄色葡萄球菌放在营养琼脂上保持在 $3 \pm 2^\circ\text{C}$ ，之后每月转移到新鲜的营养琼脂 48 ± 8 小时，温度为 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 。将一接种环量的细菌加入到 10ml 的营养液体培养基中，并在 $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 的条件下培养 24 ± 4 小时。

将 100 倍的金黄色葡萄球菌稀释液制成 1ml 的培养液，加入 99ml 的营养液体培养基中，在试验中使用这一稀释液。

2. 准备并标注 $2 \times 2\text{cm}$ 的方格纸载体并将其放置在培养皿中

在 121°C 的时候，将方格纸剪成 $2 \times 2\text{cm}$ ，并放入一个盖着的烧杯中蒸汽消毒大约 20 分钟。将无菌的 $2 \times 2\text{cm}$ 的正方形纸片载体放入金黄色葡萄球菌稀释液中浸泡大约 60 秒的时间。使用被火烧过的镊子将正方形纸片载体移动，抖掉多余的部分，将其放在无菌的塑料培养皿中。每个培养皿中放置三个正方形纸片。

3. 应用普境安和竞争产品

将普境安和竞争产品立即从一个类似盐瓶的小瓶子中撒到培养皿中细菌标记的方格纸上。在培养皿中添加的每一种检测产品的适当数量如下：

得出培养皿的面积。 $A = (\pi)(r^2)$

$$A = 3.14 (50)^2 = 7850\text{mm}^2$$

On Guard (新的普境安产品)

使用剂量： $1 \text{ lb}/100\text{ft}^2$

$$\text{第一次转换 lbs. 到 g: } \frac{1 \text{ lb.}}{1} \times \frac{453.6 \text{ g}}{1 \text{ lb.}} = 453.6 \text{ g}$$

$$\text{下一次转换 } \text{ft}^2 \text{ 到 } \text{m}^2: \frac{100\text{ft}^2}{1} \times \frac{0.0929\text{m}^2}{1\text{ft}^2} = 9.29\text{m}^2$$

转换 9.29m² 到 1m²: $\frac{453.6\text{g}}{9.29\text{m}^2} = 48.83\text{g}/\text{m}^2$

得出每个培养皿需要的量。

$$\frac{48.83\text{g}}{1\text{m}^2} \times \frac{1\text{m}^2}{10^6\text{mm}^2} \times \frac{7850\text{mm}^2}{1} = 0.383\text{g}/\text{培养皿}$$

Staldren

使用剂量: 50g/m²

得出每个培养皿需要的量。

$$\frac{50\text{g}}{1\text{m}^2} \times \frac{1\text{m}^2}{10^6\text{mm}^2} \times \frac{7850\text{mm}^2}{1} = 0.393\text{g}/\text{培养皿}$$

Stable Boy

使用剂量: 2kg/9m²

第一次转换 kg 到 g: $\frac{2\text{kg}}{1} \times \frac{1000\text{g}}{1\text{kg}} = 2000\text{g}$

下一次转换 9m² 到 1m²: $\frac{2000\text{g}}{9\text{m}^2} = 222\text{g}/\text{m}^2$

得出每个培养皿需要的量。

$$\frac{222\text{g}}{1\text{m}^2} \times \frac{1\text{m}^2}{10^6\text{mm}^2} \times \frac{7850\text{mm}^2}{1} = 1.74\text{g}/\text{培养皿}$$

Barn Fresh

使用剂量: 18kg/45m²

第一次转换 kg 到 g: $\frac{18\text{kg}}{1} \times \frac{1000\text{g}}{1\text{kg}} = 18,000\text{g}$

下一次转换 9m² 到 1m²: $\frac{18,000\text{g}}{45\text{m}^2} = 400\text{g}/\text{m}^2$

得出每个培养皿需要的量。

$$\frac{400\text{g}}{1\text{m}^2} \times \frac{1\text{m}^2}{10^6\text{mm}^2} \times \frac{7850\text{mm}^2}{1} = 3.14\text{g}/\text{培养皿}$$

Mistral

使用剂量：100g/m²/牛舍

得出每个培养皿需要的量。

$$\frac{100\text{g}}{1\text{m}^2} \times \frac{1\text{m}^2}{10^6\text{mm}^2} \times \frac{7850\text{mm}^2}{1} = 0.785\text{g/培养皿}$$

Sweet PDZ

使用剂量：5-6 杯/144ft²，6 杯 = 48 盎司

转换 oz 到 g:

$$\frac{48}{1\text{oz}} \times \frac{28.35\text{g}}{1\text{oz}} = 1360.8\text{g}$$

转换 144ft²到 m²:

$$\frac{144\text{ft}^2}{1\text{ft}^2} \times \frac{0.0929\text{m}^2}{1\text{ft}^2} = 13.38\text{m}^2$$

转换 13.38m²到 1m²:

$$\frac{1360.8\text{g}}{13.38\text{m}^2} = \frac{101.7\text{g}}{1\text{m}^2}$$

得出每个培养皿需要的量。

$$\frac{101.7\text{g}}{1\text{m}^2} \times \frac{1\text{m}^2}{10^6\text{mm}^2} \times \frac{7850\text{mm}^2}{1} = 0.785\text{g/培养皿}$$

4. 细菌暴露于普境安和各种竞争产品之后，检测存活的金黄色葡萄球菌的 CFU。

试验 1 中，在暴露时间分别为 30 分钟、8 小时和 24 小时后，用火烧过的镊子将每个 2×2 厘米的方格纸载体从培养皿中取出，放入一个 10ml DE+0.5% 的甘氨酸的试管中。该试管在涡流振荡器振荡 60 秒，以清除所有存活的金黄色葡萄球菌。连续 10 倍稀释的稀释剂被制成 1ml 到 9ml，将从不同的稀释管中得到的 0.5ml 的样本转移到培养皿中的营养琼脂 (NA) 的表面。这些培养皿的培养时间为 48±8 小时，温度为 35±2°C。用适当的稀释因子计算出菌落数量以确定每个 2×2cm 的方格纸载体上存活的 CFU。

对每个产品每个暴露时间下转移和检测 3 个正方形纸片。

每个产品的每个暴露时间取 3 个方格纸进行分析。

对于试验 2，这个过程重复试验 1，但是暴露时间只有 24 小时。

对于对照组，重复上述过程，包括零时间点、使用未经处理（不暴露于普境安或竞争产品）的细菌标记的方格纸，以确定每个暴露时间中细菌的存活数量。为了防止因干燥而导致金黄色葡萄球菌的死亡，如果看起来干燥的话，将大约 0.1ml 的无菌营养液体培养液添加到放方格纸上。

5. 计算普境安和竞争产品的杀死和抑制百分比

通过各种检测产品计算出金黄色葡萄球菌的杀死百分比，如下列公式所示：

$$\% \text{ 杀死} = \frac{1 - S_0 - S}{S_0} \times 100$$

S = 暴露与检测物质后存活的 CFU。

S₀ = 在零时间点时，标记在方格纸（对照组）上的原始 CFU。

而通过各种检测产品计算出金黄色葡萄球菌的抑制百分比，如下列公式所示：

$$\% \text{ 抑制} = \frac{1 - S_r - S}{S_r} \times 100$$

S = 暴露与检测物质后存活的 CFU。

S_r = 在每个暴露时间，标记在正方形纸片（对照组）上的 CFU

6. 中和反应的可行性验证

为了验证普境安和竞争产品的中和反应的可信性，将两个 2×2cm 的无菌方格纸放入无菌的离子水里浸泡大约 60 秒。用火烧过的镊子将这些载体放在无菌的培养皿中，并迅速撒上了试验产品。将每个方格纸转移到一个 10ml 的试管中，该中和反应的浓度与在检测中使用浓度一致。将 10 倍的稀释液制成 1ml 溶液，加入 9ml 的 DE，每个试管在 1ml 的培养液中加入大约 1000CFU。将每个稀释管的 1.5 倍，即 0.5ml 转移到培养皿中的营养琼脂表面进行检测，并计算出金黄色葡萄球菌的菌落数量。对被检测的产品进行两次以上的检测。

相比之下，在 1ml 的培养液中，两个 10ml 的中和复苏培养液试管中加入了大约 1000CFU。将每个稀释管的 1.5 倍，即 0.5ml 转移到培养皿中的营养琼脂表面进行检测，并计算出金黄色葡萄球菌的菌落数量。所有培养皿上的相似数量的菌落都证实其有中和能力。每个检测产品的中和能力必须进行有效检测。

结果

试验 1

在试验 1 中，检测了一款新的竞争产品 Sweet PDZ，与普境安 (On Guard) 一起，暴露时间为 30 分钟、8 小时和 24 小时。普境安在 30 分钟、8 小时和 24 小时内分别杀死了 21.83%、89.01%和 92.01%的金黄色葡萄球菌。Sweet PDZ 在 30 分钟内杀死了 3.52%的金黄色葡萄球菌，在 8 小时和 24 小时内杀死了 0%的金黄色葡萄球菌。

普境安在 30 分钟、8 小时和 24 小时内分别抑制了 3.0%、97.91%和 99.97%的金黄色葡萄球菌。在 30 分钟、8 小时和 24 小时内，Sweet PDZ 抑制了 0%的金黄色葡萄球菌。

试验 2

在试验 2 中，四个竞争产品与普境安 (On Guard) 一起检测，暴露时间为 24 小时。24 小时内，普境安杀死了 99.45%的金黄色葡萄球菌，所有四种竞争产品杀死了 0%的金黄色葡萄球菌。

24 小时内，普境安抑制了 99.9996%的金黄色葡萄球菌。然而，24 小时内，Staldren、Barn Fresh、Mistral 和 Stable Boy 分别抑制了 88.42%、95.73%、91.52%和 56.90%的金黄色葡萄球菌。

讨论

在本试验中每个产品的每次检测都得到了杀死和抑制百分比，在长时间暴露的情况下，对照组存活的菌落形成数量（CFU）将会增加，这意味着在控制范围内金黄色葡萄球菌的数量增加了。为了计算杀死百分比，处理过的方格纸（撒上检测产品）与零时间点未处理的方格纸（对照组）进行相比，而抑制百分比则是在相同的暴露时间内将处理过的方格纸与未处理的方格纸进行比较。

对于试验 1，三种新的竞争产品（之前没有检测过）之一（Sweet PDZ）在不同的暴露时间和普境安一起检测。普境安在 24 小时内杀死了 92.25% 的金黄色葡萄球菌，抑制了 99.97% 的金黄色葡萄球菌。然而，在 24 小时内，Sweet PDZ 杀死了 0%，并抑制了 0% 的金黄色葡萄球菌。

EnviroShield 和 Poultry Litter Treatment (PLT) 是另外两种竞争产品。在初步的中和反应试验中，EnviroShield 受到了高度污染，我们无法得到足够的数据来确定是否发生了中和。因此，我们查阅了 EnviroShield 的成分，发现酿酒酵母（酵母）是其中一种成分。我们做了一项研究，以检测 0.5g EnviroShield 中发现的金黄色葡萄球菌数量，并确定我们是否可以对该产品进行充分地检测。结果表明，在 0.5g EnviroShield 样本中，平均有 1.03×10^5 CFU 金黄色葡萄球菌。由于金黄色葡萄球菌的浓度高，我们决定不进行可行的检测，产品并没有经过检测。

竞争产品 PLT 没有经过检测，因为我们无法中和它。我们观察到，PLT 的 pH 值在 1 以下。这种竞争产品是酸性的，它的毒性对动物来说可能不安全。

试验 2 中，之前检测的四种竞争产品被重新检测，暴露时间为 24 小时。在 24 小时的暴露时间内，四种竞争产品杀死了 0% 的金黄色葡萄球菌，分别抑制了 88.42% (Staldren)、95.73% (Barn Fresh)、91.52% (Mistral) 和 56.90% (Stable Boy) 的金黄色葡萄球菌。竞争产品的抑制百分比差异可能是由于每种产品的不同的试验浓度，这意味着不同量的各种产品可能会导致金黄色葡萄球菌的干燥和死亡。

结论

我们发现普境安在室温下 24 小时内杀死了 92.25%–99.45%，抑制了 99.97%–99.9996% 的金黄色葡萄球菌。普境安比竞争产品多杀死了至少 80%，多抑制了至少 4% 的金黄色葡萄球菌。普境安的抗菌活性比 Staldren、Barn Fresh、Mistral、Stable Boy 和 Sweet PDZ 都要强。

表 1. (试验 1) 细菌暴露于普境安后金黄色葡萄球菌的平均杀死 (%) 和平均抑制 (%), 作为时间函数, 在 2×2cm 的方格纸载体上撒上竞争产品。

产品名称	暴露时间	平均杀死 (%)	平均抑制 (%)
普境安	30 分钟	21.83%	3.50%
	8 小时	89.01%	97.91%
	24 小时	92.25%	99.97%
Sweet PDZ	30 分钟	3.52%	0%
	8 小时	0%	0%
	24 小时	0%	0%

表 2. (试验 2) 细菌暴露于普境安后金黄色葡萄球菌的平均杀死 (%) 和平均抑制 (%), 作为时间函数, 在 2×2cm 的正方形纸片载体上撒上竞争产品。

暴露时间	产品名称	平均杀死 (%)	平均抑制 (%)
24 小时	普境安	99.45%	99.9996%
	Staldren	0%	88.42%
	Barn Fresh	0%	95.73%
	Mistral	0%	91.52%
	Stable Boy	0%	56.90%

最终研究报告结尾

研究课题

普境安和各种竞争产品在潮湿条件下对金黄色葡萄球菌的抗菌活性检测 2

MicroChem Laboratory 项目认证编号

050405-1, 050412-2

这项研究于 2005 年 4 月 5 日开始，并于 2005 年 4 月 21 日完成，以下为该最终研究报告研究总监的签署日期。

主研究员——Jennifer Dunham

签署日期

研究助理——Brandon Musgrove

签署日期

Norman Miner, Ph. D.
研究总监
MicroChem Laboratory, Inc.
1107-C S. Airport Circle
Eules, TX 76040

签署日期

(备注：此文件仅为中文翻译文件，签名请参考英文原文)