

微生物对工业杀菌剂的抗药性研究进展*

王春华 谢小保 曾海燕 欧阳友生** 陈仪本

(广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物研究所 广州 510070)

摘要 就微生物对工业杀菌剂的抗药性概念、研究概况及抗药性的产生机理进行了介绍,为科学合理使用和开发新型工业杀菌剂提供科学依据。

关键词 工业杀菌剂,微生物,抗药性

中图分类号 Q93 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(2007)04-0791-04

The Developments of Microbial Resistance to Industrial Antiseptics and Disinfectants*

WANG Chun-Hua XIE Xiao-Bao ZENG Hai-Yan OUYANG You-Sheng** CHEN Yi-Ben

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070)

Abstract These years with industrial antiseptics and disinfectants widely used, especially unscientifically used, the resistance of microorganisms is more and more serious, which brought much more difficulties to industrial producing. The developments on the resistance of microorganisms to industrial antiseptics and disinfectants, their resistant mechanisms and the control strategies are reviewed, which aids us to reasonably use industrial organic antiseptics and disinfectants in existence and provides academic and scientific basis.

Key words Industrial antiseptics and disinfectants, Microorganism, Resistance

微生物对抗生素产生抗药性已是众所周知的事情。事实上,微生物的抗药性现象已不仅仅限于抗生素,早已扩展到消毒剂、农业杀菌剂、工业杀菌剂等领域。尤其近二十年来,各类杀菌剂已广泛应用于洗涤用品、涂料、粘合剂、纸浆、纺织品、冷却循环水、金属加工液和塑料,成为保护各类材料和产品免受微生物危害最有效的手段之一。但杀菌剂在工业领域的广泛应用,为微生物抗药性的产生提供了有利条件。近年来,作者对食品、化妆品、饲料、水性涂料和水性粘合剂等行业的霉腐微生物区域分布及其控制技术进行了广泛的调查和研究,陆续发现不少杀菌剂在连续使用若干年后菌群的抗药性已发生,杀菌防腐效果逐步下降。有些工厂为了减少霉腐微生物的危害,盲目加大杀菌剂的使用量,不仅给霉腐微生物形成很强的选择压力,而且为人类生存环境和自然生态平衡造成很大污染和破坏。

研究微生物对工业杀菌剂的抗药性,有利于采

取相应治理措施和方法,延缓微生物对工业杀菌剂抗药性的产生速度,提高食品、化妆品、涂料等工业材料和制品的质量,为合理使用和开发新型工业杀菌剂提供科学依据,还可避免因盲目、大量使用杀菌剂对人类生存环境和自然生态平衡造成的不良影响。

1 微生物对工业杀菌剂的抗药性和耐药性概念

1.1 微生物对工业杀菌剂的抗药性

微生物对工业杀菌剂的抗药性是指由于某一类(种)工业杀菌剂长期连续使用而引起靶标菌群对杀菌剂的敏感性降低,从而造成杀菌防腐效果下降。在个体水平上则表现为微生物菌株对杀菌剂敏感性发生可遗传的降低。简言之,微生物对工业杀菌剂的抗药性最本质的特性是微生物个体为了适应或抵抗环境的变化而发生的可遗传的变异。

* 广东省自然科学基金(No.0610448)

** 通讯作者 Tel 020-87688142, E-mail: hellowch@163.com

收稿日期 2006-11-20, 修回日期 2006-12-28

1.2 微生物对工业杀菌剂的耐药性

微生物对工业杀菌剂的耐药性是指原来的工业杀菌剂使用量不再能有效杀死或抑制微生物的生长。以下两种原因都可能使微生物产生耐受性：①微生物适应环境,形成了保护性的生物膜；②微生物个体发生了可遗传的变异。

2 微生物对工业杀菌剂的抗药性研究概况

20 世纪 40 年代初首先出现了细菌对医用抗生素的抗药性,而微生物对工业杀菌剂的抗药性最早可追溯到 1951 年。1952 年,Chaplin 首次分离到对季铵盐类杀菌剂有抗药性的菌株^[2]。六十年代后,人们又相继发现洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)、产碱杆菌(*Bacterium alcaligenes*)、灵杆菌(*B. prodigiosum*)、白假丝酵母菌(*Candida albicans*),甚至凝固酶葡萄球菌(*CNS*)等许多菌株对季铵盐类杀菌剂(QACs)产生了抗药性^[3]。此后对工业杀菌剂抗性研究的学者越来越多,Chapman 等多种工业杀菌剂产生抗药性的微生物进行了广泛而深入的调查,发现所分离到的抗药性菌株大多数属于假

单胞菌属和伯克氏菌属(*Burkholderia*) (图 1)^[4]。Sidhu 等人对从丹麦、挪威两地食品中所分离到的大肠菌进行了调查分析,发现约 1% 的菌株对杀藻胺(BC)具抗药性^[5]。王红卫等从受污染的苯扎溴铵中分离到大量铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)^[6]。

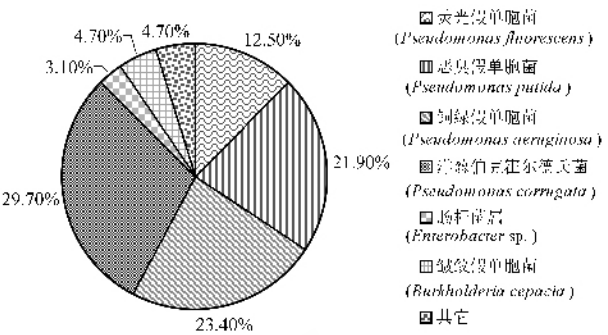


图 1 对工业杀菌产生抗药性的微生物属种比例图

自从 Bogolyubov 观察到在氯浓度足够大的水中有细菌生存,此后陆续有人发现微生物对尼泊金酯、卡松、三氯生、洗必泰等也会产生抗药性。表 1 列出了自从 1942 年后见诸文献的已发现抗药性菌株的工业杀菌剂^[7]。

表 1 已报道产生抗药性菌株的工业杀菌剂

英文名称	中文名字	英文名称	中文名字
Benzalkonium chloride	苯扎氯铵(新洁尔灭)	Hexahydrotriethyl triazine	均三嗪
Benzisothiazolone	BIT	Imidazolynil urea	咪唑烷基脲
Benzoic acid	苯甲酸	Methylenevischlorophenol	亚甲基三氯苯酚
Chloroallyl triazine-azoniadamantane	CTAA	Methylchloro/methyl isothiazolone	卡松(Kathon)
Chloranmine	氯胺	Methyl paraben	尼泊金甲酯
Chlorhexidine	洗必泰	Phenoxyethanol	苯氧基乙醇
Chlorophenol	氯酚	Phenylethyl alcohol	苯酸乙醇
Dibromodicyanobutane	溴菌腈(DBCB)	Propyl paraben	尼泊金乙酯
dimehtyloxazolidine	二甲基恶唑啉	Quaternary ammonium cmpds	季铵基盐(QAC)
Dimethyldithiocarbamate	二甲基二硫代氨基甲烷	Sorbic acid	山梨酸
Dimethoxydimethyl hydantoin	二羟甲基二甲基乙内酰脲(DMDMH)	Tetrahydrothiazinthione	四氢噻唑
Formaldehyde	甲醛	Trifluoromethyl dichlorcarbanilide	三氟甲烷二氯-N-碳酸苯铵
Glutaraldehyde	戊二醛	Triclosan	三氯生(玉洁新,DP300)
Mercuric salts	汞盐	iodine	碘
Hydrogen peroxide	过氧化氢	carbendazim	N-(2-苯并咪唑基)氨基甲酸酯
Chlorothalonil	四氯间苯二甲腈	2-Brome-2-nitropropane-1,3-diol	布罗波尔(Bromopol)
Diazolidinyl urea	重氮咪唑烷基脲	Benzalkonium chloride	杀藻胺(BC)
Silver salts	银盐		

像抗生素抗性一样,微生物对工业杀菌剂也存在交叉抗药性。1972 年 Carson 发现铜绿假单胞菌对戊二醛、二氧化氯和 QACs 的交互抗药性^[8]。80 年代后,关于微生物对杀菌剂交叉抗药性的报道逐渐增多^[9],其中多数是关于 QACs 和过氧化物的交叉抗性的研究报道。Dukan 和 Touati 研究表明过氧化氢和次氯酸均可诱导产生 oxyR 自由基防御系统,该系统可导致过氧化氢和次氯酸以及甲醛和卡松的交叉抗药性^[10]。此外,一些对甲醛和卡松具抗药性的微生物对过氧化氢也具有交叉抗药性^[4]。Sadhu^[11]、Joynson^[12]及 Langsrud 等^[13]分别研究了食品工业中分离到的葡萄球菌、铜绿假单胞菌和大肠杆菌(*Escherichia coli*)对 QACs 的交叉抗药性,结果表明此类抗药性与位于质粒上的非特异性的多重药物排出泵有关。此后,随着工业的迅速发展和工业杀菌剂的广泛使用,国内外科学家陆续发现微生物对卡松、洗必泰、新洁尔灭、戊二醛、甲醛等也会产生交叉抗药性^[7]。

3 微生物对工业杀菌剂的抗药性机制

国外不仅对抗生素和消毒剂的抗性机制研究相当重视,而且对工业杀菌剂的抗性研究也从一般性的调查到生化机制以及深入到分子和基因水平的研究。就目前的研究结果看,主要有以下 4 个方面(1)微生物产生一种或几种水解酶或钝化酶来水解或修饰进入细胞内的杀菌剂,使之失去生物活性。(2)杀菌剂的作用靶位(蛋白和 DNA)由于发生突变或被微生物产生的某种酶修饰而使杀菌剂无法发挥作用。(3)由于微生物细胞膜渗透性的改变或其它有关特性的改变。(4)微生物具有一种依赖于能量的主动外排系统。

微生物的外膜除了限制胞浆分子渗透到细胞外,也限制环境中的分子进入细胞内。如肠杆菌科的许多菌株不如革兰氏阳性菌对多种杀菌剂敏感,其原因可能是细胞外层的化学组成及结构不同。异噻唑啉酮及其衍生物(卡松)是近年来应用越来越广的一种杀菌剂,其杀菌机理是与微生物细胞内的蛋白质结合,使细胞呼吸停顿,迅速抑制微生物的生长和生物高分子的合成。随着细胞内蛋白质不断被氧化,从而导致微生物的死亡。Brözel 研究铜绿假单胞菌外膜蛋白(T 蛋白)发现,当 T 蛋白表达或转录受抑制时,铜绿假单胞菌对异噻唑啉酮产

生抗药性^[14]。Chapman 对不同分离菌株的研究也证明了菌株外膜蛋白的改变与卡松抗性有关^[4]。不少研究还表明了微生物细胞膜的脂质成分与微生物的敏感性存在联系。一些微生物还可直接代谢某类工业杀菌剂,从而获得抗药性。如杆状假单胞菌、棒状杆菌、微球菌、曲霉菌可以通过 β -酮酰基化途径降解苯甲酸成为琥珀酸和乙酰辅酶 A^[15]。

此外,许多具有表面黏附固着群落特性的细菌能够形成有保护作用的生物膜。此类细菌往往对杀菌剂和消毒剂具有较高的抗药性和耐药性,是水处理和造纸工业中杀菌或消毒失败的潜在因素。早在 20 世纪 70 年代,一些微生物学家就意识到了细菌的这种特性并对微生物菌膜进行了深入研究,并建立了微生物厚生物膜的动力模型。此外有研究发现薄生物膜也能降低微生物对过氧化氢和一氯化物的敏感性^[16],有人推断此抗药性与厚生物膜单纯的保护作用不一样,其可能是其它基因表达的结果^[17]。

三氯生是具有广谱抗菌作用的杀菌剂,其对人体和环境安全,且与各类日化原料和产品配伍性好,因此被广泛应用在医药、日用品、化妆品、洗涤用品及纺织工业中。McMurry 等研究表明三氯生是一种对细菌具有特异性作用位点的杀菌剂,可抑制大肠杆菌的脂质合成。但大肠杆菌的 *fabI* 基因发生突变或者过量表达时,其对三氯生产生抗药性^[18]。Heath 等进一步研究了微生物对三氯生的抗性机制,发现肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)中不存在 *fabI* 基因,但具有一种特异性的三氯生抗性黄素蛋白 FabK,其功能与 *fabI* 基因相似,可编码链球菌和梭菌属对三氯生的抗药性^[19]。

然而,大多数工业杀菌剂都是多位点抑菌剂^[20],因此微生物改变工业杀菌剂的作用位点获得抗药性不是其主要抗药性机制。微生物可产生一种或几种水解酶或钝化酶来水解或修饰进入细胞内的杀菌剂,使之失去生物活性,如甲醛及甲醛释放物。在微生物正常的生理活动中,甲醛(FA)是碳水化合物代谢的中间产物,细胞内生成的 FA 可被甲醛脱氢酶(FD)降解生成甲酸盐和降解的 NAD^[8]。过量的 FD 可导致实验室分离的假单胞菌对许多金属加工液中使用的甲醛类杀菌剂产生抗药性^[21]。也有研究证明铜绿假单胞菌、恶臭假单胞菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、肠杆菌属等因高水平的 FD 而获

得了对甲醛释放类杀菌剂二羟甲基二甲基乙内酰胺的抗药性^[9]。

微生物还有一种重要的抗药性机制即依赖于能量的主动外排系统。主动外排泵最初发现于哺乳动物的癌细胞,在20世纪80年代的早期又有报道这种药物转运子存在于施用了四环素的细菌中^[22]。如今人们发现主动外排泵存在于所有的生活细胞内,包括革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌、原生动物以及癌细胞。QACs是广泛应用于卫生用品和食品工业的杀菌剂,对其抗性机制研究比较透彻。研究表明金黄色葡萄球菌的QACs外排系统是由两个基因系统编码: *qacA* 和 *qacB* 编码高水平的抗药性, *qacC* 和 *qacD* 编码低水平的抗药性。铜绿假单胞菌也具有3个与QACs外排系统相似的外排系统: *MexA-MexB-OprM*、*MexC-MexD-OprJ* 和 *MexE-MexF-OprN*^[23]。此外对酵母菌的适应性研究也表明其细胞膜上的酶(H^+ -ATP酶)和转移子 *pdr12* 分别将细胞内的 H^+ 和杀菌剂阴离子排出细胞,从而维持细胞正常的新陈代谢^[24]。

值得指出的是,由于一种工业杀菌剂对不同的微生物的杀菌机理不同,因而不同微生物对同一种工业杀菌剂的抗药性机理也不相同。

4 结束语

据报道,一个新型杀菌剂的开发从研制到最终商品化通常需要8~10年,合成和筛选80000个化合物,耗资8000万~1.5亿美元^[25]。鉴于目前工业领域中杀菌剂的广泛应用以及抗药性菌株的不断出现,如不科学合理使用,有可能微生物对杀菌剂抗药性产生的速度要大于杀菌剂开发的速度,使得可供使用的杀菌剂越来越少,给工业生产带来很大的困难。而开发多作用位点或新的作用机制的杀菌剂以及将不同作用机制的杀菌剂进行科学复配,是进行抗性治理的有效途径。因此应做好以下几方面的工作(1)进一步深入研究微生物对工业杀菌剂的抗药性,充分利用现代的分子生物学技术,加强微生物抗药性基因的标记、定位及克隆研究,揭示微生物对工业杀菌剂的分子机制(2)进一步加强杀菌剂杀菌机理的研究(3)加强工业杀菌剂抗性风险评估和治理措施的研究。

参考文献

- [1] 陈代杰. 抗菌药物与细菌耐药性,上海:华东理工大学出版社, 2001. pp. 17~41.
- [2] Chaplin C E. *Journal of Applied Bacteriology*, 1952 **63**: 453~458.
- [3] 顾春英, 薛广波. 疾病控制杂志, 1997, **1**(2): 83~87.
- [4] Chapman J S. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1998, **41**: 241~245.
- [5] Sidhu M S, Swrum H, Holck A. *Microbial Drug Resistance*, 2002, **8**: 393~399.
- [6] 王红卫, 季华, 张玲玉, 等. 中国感染控制杂志, 2006, **5**(2): 146~147.
- [7] Chapman J S, Diehl M A, Fearnside K B. *International Journal of Cosmetic Science*, 1998, **20**(1): 31~39.
- [8] Chapman J S. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, **51**: 133~138.
- [9] Langsrud S, Sidhu M S, Heir E, et al. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, **51**: 283~290.
- [10] Dukan S, Touati D. *Journal of Bacteriology*, 1996, **178**(22): 6145~6150.
- [11] Sidhu M S, Heir E, Sorum H, et al. *Microbial Drug Resistance*, 2001, **7**: 363~371.
- [12] Joynson J A, Forbes B, Lambert R J W. *Journal of Applied Microbiology*, 2002, **93**(1): 96~107.
- [13] Langsrud S, Sundheim G, Holck A L. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, **96**(1): 201~208.
- [14] Brözel V S, Cloete T E. *Journal of Applied Bacteriology*, 1994, **76**: 576~582.
- [15] 曾锋, 张立彦, 曾庆孝. 食品与机械, 2005, **21**(2): 51~53.
- [16] Cochran W L, McFeters G A, Stewart P S. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **88**(1): 22~30.
- [17] Chapman J S. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, **51**: 271~276.
- [18] Mechin L, DuBois-Brissonet F, Heyd B, et al. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, **86**(5): 859~866.
- [19] Heath B, Rock C O. *Nature*, 2000, **406**(6792): 145~146.
- [20] Meyer B. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, **4**: 2~5.
- [21] Sondossi M, Rossmore H W, William R. *International Biodeterioration*, 1989, **25**: 423~437.
- [22] Pages J, Masi M, Barbe. *Journal of Trend in Molecular Medicine*, 2005, **11**(8): 226~235.
- [23] Cloete T E. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, **51**: 277~282.
- [24] 郭新竹, 宁正祥. 食品与发酵工业, 2001, **27**(2): 72~75.
- [25] 林孔勋. 杀菌剂毒理学, 北京: 中国农业出版社, 1995. pp. 101~140.