

细菌对消毒剂抗性机理研究进展

吴清平^{1*} 李飞^{1,2} 张菊梅¹

(1. 广东省微生物研究所 广东省华南应用微生物重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地
广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

(2. 华南理工大学 生物科学与工程学院 广东 广州 510006)

摘 要: 消毒剂通过抑制膜的主动运输、抑制微生物的代谢、扰乱微生物的 DNA 复制、使微生物细胞裂解而导致胞内成分渗漏以及使胞内物质凝结等方面发挥灭菌作用。消毒剂在杀灭细菌和控制细菌污染方面具有重要作用,但细菌对消毒剂也会产生抗性。细菌对消毒剂的抗性机制主要通过形成生物被膜,阻挡或外排机制减少消毒剂分子进入细胞,使消毒剂分子失活,以及其他表型性耐药等4个途径来实现,其中通过形成生物被膜阻止消毒剂分子进入细菌细胞或在进入细胞前使消毒剂失去效用,在细菌对消毒剂的抗性机制中具有重要作用。以实际污染的主要菌株为对象,研究它们对常用消毒剂的抗性机制,对控制细菌污染具有极大的应用价值和现实意义。

关键词: 消毒剂, 抗性, 机制, 生物膜, 流出泵

The research progress of bacterial disinfectant-resistance mechanisms

WU Qing-Ping^{1*} LI Fei^{1,2} ZHANG Ju-Mei¹

(1. State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

基金项目: 国家农业科技成果转化项目(No. 2011GB2E000013); 广东省科技计划项目(No. 2011B030800003)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-20-87688132; 信箱: wuqp203@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-10-08; 接受日期: 2013-01-15

Abstract: The way in which disinfectants effect sterilization can be summarized into the following aspects: restrict the active transport of membrane; hinder the metabolism of microorganisms; disturb the DNA duplication of microorganisms; and break the microbial cells in a bid to bring about the leakage of intracellular constituents and condensation of intracellular constituents. Disinfectant plays an important role in controlling and killing bacteria, but the bacteria can also acquire resistance to disinfectants. The mechanisms of bacterial disinfectant-resistance can be active through formation of biofilm, prevention or efflux system to reduce penetrating disinfectant molecules, inactivation of the disinfectant, and some other disinfectant resistance phenotype and so on. Among these mechanisms, the biofilm has a great importance because it can prevent the disinfectant molecules from penetrating into the bacterial cells or inactivate the disinfectants before they have penetrated into the cells. It is suggested that studies centered on the resistance mechanism of major actually-contaminated bacteria have great value and practical significance in controlling the contamination of bacteria in the future.

Keywords: Disinfectant, Resistance, Mechanism, Biofilm, Efflux pumps

消毒剂在杀灭细菌和控制细菌污染方面具有重要作用,但细菌也会对消毒剂产生抗性,从而影响和削弱消毒剂的作用效果。早在 1887 年就有学者发现,为了控制细菌污染,长时间应用一些化学试剂(如硼酸或升汞),其使用剂量会不断增加,后来的研究发现,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)和炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthraci*)对间苯二酚、苯酚、水杨酸和升汞会产生适应性^[1]。细菌对杀菌剂产生抗性是必然的,几乎没有发现哪种物质可避免细菌对其产生抗性。

细菌对消毒剂抗性的产生不仅会使消毒剂的消毒效果削减甚至失效,从而使国民经济蒙受巨大的损失,而且还会严重影响人类的健康。美国从 1971 年到 2006 年的 35 年间,共发生 129 次由细菌引起的饮用水疫情,共导致了 22 572 例病例,而这些疫情的产生,很大一部分原因就是由于消毒剂失效而引起的^[2]。还有研究发现,细菌甚至会通过污染消毒剂而发生大规模的感染,据美国 CDC 统计,每年与卫生保健相关的细菌感染约为 170 万例,其中死亡 99 000 例,这其中很

多感染的病例是由于消毒不够彻底以及细菌产生了抗性造成的^[3]。因此,加强细菌对消毒剂的抗性机理研究,对提高消毒剂的使用效果具有重要意义。本文主要从消毒剂的灭菌机制切入,对细菌抗消毒剂的抗性机制进行阐述和归纳,为细菌抗消毒剂机理研究和研发新型消毒剂提供参考。

1 消毒剂对细菌的杀灭机理

消毒剂种类繁多、作用机制多样,其对微生物的作用机制可总结为物理作用、离子相互作用和化学反应三大类。离子相互作用主要指磷脂的静电作用。物理反应则包括溶解膜结合蛋白、渗入或切割磷脂双分子层、代替磷脂分子以及解磷脂等,化学反应包括自由基氧化、金属离子螯合、嵌入反应、烷化反应、卤化作用以及氧化反应。消毒剂主要引起的抗菌作用包括氧化磷酸化解偶联从而抑制膜的主动运输、抑制微生物的代谢、扰乱微生物的 DNA 复制、破坏膜结构使胞内成分渗漏、导致微生物细胞裂解以及使胞内物质凝结等方面^[4],具体详见表 1。

表 1 常见消毒剂的作用机制和相应的抗菌作用^[4]
Table 1 Mechanisms of common disinfectants and the consequential antibacterial effects^[4]

作用机制 Mechanisms of interaction	消毒剂 Disinfectants	作用位点 Target site	抗菌作用 Antibacterial effects
Ionic interactions			
Electrostatic interaction with phospholipids	QACs, chlorhexidine, polyhexamethylene biguanides	Cytoplasmic membrane; membrane-bound enzyme	Leakage; respiratory inhibition; intracellular coagulation
Physical interactions			
Membrane-protein solubilization	Anionic surfactants	Cytoplasmic membrane; membrane-bound enzyme	Leakage, uncoupling of energy processes; lysis
Penetration into phospholipid bilayer; possible displacement of phospholipid molecules	Weak acids, 2-phenylethanol	Transmembrane pH gradient; membrane integrity	Leakage; disruption of transport, respiratory and energy coupling process
Solution of phospholipids	Aliphatic alcohols	Membrane integrity	Leakage
Chemical reactions			
Free-radical oxidation	Hydrogen peroxide, peracetic acid	Enzyme and protein thiol groups	Metabolic inhibition
Metal ion chelation	EDTA	Gram-negative cell wall	Metabolic inhibition
Intercalation	Amino acridines	DNA base pairs	Replicative injury
Alkylation reactions	Glutaraldehyde, formaldehyde	Biomolecules (e.g. protein, RNA, DNA) containing amino, imino, amide, carboxyl and thiol groups	Metabolic and replicative inhibition; possibly some cell wall damage
Halogenation	Hypochlorites	Amino groups in proteins	Metabolic inhibition
Oxidation of thiol group	Heavy metal salts, organochlorine derivatives	Thiol-containing cytoplasmic, membrane-bound enzymes	Metabolic inhibition

近年来, 本研究团队在饮用水微生物安全控制方面的研究发现, 二氧化氯通过破坏细胞膜的渗透发挥消毒作用^[5], 臭氧与铜绿假单胞菌发生作用时, 会使铜绿假单胞菌的胞内钾离子、镁离子和 ATP 发生泄漏, 从而产生杀灭作用。但是, 过高浓度的臭氧又会带来溴酸盐等消毒副产物, 因此, 必须兼顾控制好臭氧浓度和杀菌效果之间的关系^[6-7]。

2 细菌对消毒剂的抗性机制

抗性被定义为, 在某种损害或抑制生物生长的物质中, 生物及其后代出现暂时或永久性的生存能力的性质。微生物的抗性是指微生物通过一些机制, 在某种常规用量的消毒剂中变得不再敏感而可以生存的性质。当前, 微生物对抗生素的

抗性问题已经有许多较为深入的研究, 但对消毒剂的抗性研究却很少。

如表 1 所示, 消毒剂有许多的作用位点, 从细胞膜到呼吸作用的相关酶, 以及胞内的遗传物质, 不同的微生物对同一种消毒剂会有不同的抗性机制。低浓度的消毒剂只会抑制微生物的生长, 高浓度的消毒剂才会杀灭微生物, 因此, 根据不同的需要可以选择不同的浓度。用高浓度的消毒剂去处理微生物时, 微生物不太可能会产生抗性, 抗性机制经常是在亚致死量的消毒剂浓度时产生的。

迄今为止, 细菌对消毒剂的抗性机制研究概括起来主要有形成生物膜, 通过阻挡或外排机制减少消毒剂进入细胞, 使消毒剂失活以及其他表型性耐药等 4 个方面。

2.1 形成生物被膜

当单细胞生物聚集在一起,形成的菌落贴附在一个固体表面,并且形成菌落被胞外多糖包裹,此时,便形成了生物被膜。生物被膜不仅可以在同种细菌间形成,也可以在不同种细菌之间形成。

许多研究证明了生物被膜在细菌抗消毒剂上的抗性作用。Kelli 等^[8]发现,当用含氯消毒剂、季胺化合物和苯酚类消毒剂 3 种消毒剂处理铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)时,形成生物膜的两种细菌存活率最高。Saitou 等^[9]发现,当用酒精、洗必太、Isojin 牌消毒剂(10%聚维酮碘)、洁尔灭(0.1%苯扎氯铵)、Tego 51 牌消毒剂(0.1%烷基二甲基乙酸安泰乐)和 Welpas 消毒剂(0.2%苯扎氯铵)6 种消毒剂处理铜绿假单胞菌 1 min,除了 Tego 51 消毒剂,其余 5 种对未形成生物被膜的铜绿假单胞菌杀灭率几乎为 100%,而对形成生物被膜的铜绿假单胞菌,只有 Welpas 消毒剂杀灭率不变,其余消毒剂的杀灭率均下降许多,Tego 51 消毒剂甚至失去杀菌作用。

消毒剂要发挥作用需要在细胞膜或细胞质中与该消毒剂的作用位点结合。当形成生物被膜之后,出现对消毒剂的抗性,是因为形成生物被膜的糖被起了阻挡消毒剂进入细胞的作用,糖被是一种聚阴离子聚合物,在生物被膜中具有离子交换树脂的作用,当置于消毒剂中,糖被会吸收大量的消毒剂分子,以保护生物膜中细胞免受消毒剂分子的毒害,从而使得消毒剂分子的扩散受影响,活性分子不能进入细胞和靶位点作用。Anderson^[10]的研究证明了糖被的作用,消毒剂杀死细菌之前,糖被内浸满了消毒剂分子,这充分证明了生物被膜中的糖被在抗消毒剂中所起的缓冲及阻止消毒剂进入细胞的作用。

此外,生物被膜还通过以下两种机制发挥抗

性作用,一是当消毒剂分子扩散时,由于会与生物被膜中的糖被发生电荷(离子)相互作用而使消毒剂失去作用;二是由于形成了生物被膜,菌落厚度变大,消毒剂分子的扩散需要更长时间,而使得细菌产生抗性^[11]。

2.2 通过阻挡或外排机制减少消毒剂进入细胞

细菌生物膜的结构发生改变,导致消毒剂分子无法进入细胞,不能与作用位点结合,也会使细菌获得抗性。通道蛋白是分子(包括消毒剂分子)通过细胞膜的通道,是必不可少的通道构成物,当丢失通道蛋白后,由于消毒剂分子不能进入细胞内,会出现细菌对消毒剂的抗性增强。研究发现当通道蛋白表达缺陷时,耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)和龟分枝杆菌(*M. chelonae*)开始对戊二醛等消毒剂产生抗性,继而发生医院内感染^[12]。Frenzel 等^[13]进一步验证了通道蛋白在细菌抵抗消毒剂时的作用,丢失通道蛋白后耻垢分枝杆菌对几种消毒剂的最低抑菌浓度(MIC)甚至上升了 100 倍。

有研究表明,当细菌对某种物质产生抗性时,细胞膜的构成成分脂肪酸也会发生变化。Dubois-Brissonnet 等^[14]进行沙门氏菌(*Salmonella*)对植物源类萜烯的抗性研究发现,膜脂肪酸成分发生改变,从而阻止杀菌剂进入细胞使细菌产生了抗性。Guérin-Méchin 等^[15-16]研究铜绿假单胞菌 ATCC 15442 对二癸基二甲基溴化铵和季胺化合物抗性作用时也发现,对消毒剂具有较强抗性的菌株铜绿假单胞菌 ATCC 15442 的细胞膜脂肪酸同样发生了变化。到目前为止,还没有研究揭示细胞膜脂肪酸成分是如何发挥作用从而使细菌对消毒剂产生抗性的。但对多种含氯消毒剂具有较高抗性的分枝杆菌进行细胞膜的脂质分析,发现 95.7%的脂质均是饱和长链脂肪酸,猜测其可能的机制是饱和的长链脂肪酸更稳定,同时其亲水特性阻止了消毒剂分子扩散进细胞^[17]。

还有一种重要的机制是流出泵 (Efflux pumps), 流出泵通过泵出胞内消毒剂分子来保护细胞, 近年来无论是革兰氏阳性菌还是革兰氏阴性菌中, 均发现了大量的流出泵。革兰氏阳性菌中, McCay 等^[18]用铜绿假单胞菌对洁而灭的耐药性进行研究, 耐性菌株中 MexAB-OprM 和 MexCD-OprJ 等外排泵基因存在过量表达。革兰氏阴性菌中, Abuzaid 等^[19]研究表明, 对洗必太等 5 种消毒剂具有较高抗性的肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*), 均能检测出其可以编码流出泵的 *cepA*、*qacΔE* 和 *qacE* 基因。

2.3 使消毒剂分子失活

微生物经过环境的诱变, 不断地进化, 产生的新菌株会使消毒剂分子失活转变为无毒形式, 从而不对微生物的生存产生影响。消毒剂分子通过以下两种方式失活: 与消毒剂分子发生化学反应从而使消毒剂分子失活或消毒剂分子被酶解; 微生物代谢产物的过量表达, 如某种酶的产生, 赋予微生物某种抗性。

对一些消毒剂, 细菌可以产生特定的酶, 将消毒剂分子转化为无毒形式。肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 中抗甲醛的细菌会分泌一种高活性 (比活性 14–25 U/mg)、可以分解甲醛的酶——谷胱甘肽依赖型甲醛脱氢酶 (EC1.2.1.1.), 这种酶由质粒编码, 但是, 假单胞菌 (*Pseudomonas*) 对甲醛的抗性基因表达却是由染色体决定的, 假单胞菌中对甲醛敏感的菌株, 其谷胱甘肽依赖型甲醛脱氢酶活性 (0.02–0.30 U/mg) 很低, 抗性菌株产生的该酶活性 (1–4 U/mg) 也远没有肠杆菌科的高^[20]。Roca 等^[21]发现, 在恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 中, 甲醛脱氢酶和甲醛歧化酶两种酶的过量表达, 介导了恶臭假单胞菌抗甲醛的性质。

此外, 过氧化物如过氧化氢和过乙酸等, 会产生氧自由基从而使细菌代谢中的酶受到干扰而影响代谢。细菌通过某些代谢产物的协同作用,

形成氧化应激反应, 阻止和修复氧自由基带来的损害。在铜绿假单胞菌中, 转录调控子 OxyR 会诱导编码细胞质酶的 *ahpCF*、*katB* 基因以及编码周质酶的 *ahpB* 基因的表达, 在过氧化氢作用下, 细胞内会大量产生 OxyR, 从而大量表达细胞质酶和周质酶, 赋予铜绿假单胞菌一定的抗性^[22]。在基因组水平上, 细菌在消毒剂的处理下, 基因调控水平发生改变, 从而适应消毒剂的存在, 获得更高的抗性。蜡芽芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 分别经过过氧化氢和过氧乙酸两种消毒剂处理后, 分析其基因组的变化, 发现细菌对这两种消毒剂所发生的反应惊人的一致, 涉及到 DNA 修复和细胞应急反应 (SOS) 的基因均大量上调^[23], 过氧乙酸处理的牛结核分枝杆菌 (*M. bovis*) 的研究中也发现了相同的情况^[24]。这些研究证明, 在过氧化物刺激下, 细胞产生了应激反应, 多种代谢产物的协同作用降低不利因素的影响, 从而获得抗性。

2.4 其他表型性抗性

表型性抗性, 是指某种菌在特定的条件下对消毒剂产生了抗性, 或在该特定的条件下 MIC 上升, 但一旦离开该条件, 便又重新变得对消毒剂敏感的一种形式。Bjergbaek 等^[25]发现, 在不利于大肠杆菌生长的情况下, 如供氧不足、生长温度不合适或碳源不足的情况下, 对苯扎氯铵的 MIC 会上升。生长在贫瘠营养状态下的肺炎克雷伯氏菌与正常培养的菌株相比, 要达到同样的消毒效果, 前者需要的液氯浓度是后者的 200 倍^[26]。生长缓慢的或生长在水中的鸟结核分枝杆菌 (*M. avium*) 对消毒剂的抗性是生长迅速的或生长在培养基上的鸟结核分枝杆菌对消毒剂抗性的 10 倍^[27]。产生这些现象的机制尚不明确, 猜测其可能的原因是, 在贫瘠的生长条件下, 细菌生长缓慢, 代谢速率骤减, 从而影响了一些消毒剂进入细胞, 因而表现出较强的抗性, 但一旦恢复生长, 便会重新吸

收消毒剂分子而恢复对消毒剂的敏感。

一些革兰氏阴性菌,尤其是芽孢杆菌属(*Bacillus*)和芽孢梭菌属(*Clostridium*)在不利于生存的环境下时,会形成芽孢,芽孢是所有细菌存在形式中抗逆性最强的一种形式^[28]。对一株野生型枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) 168 菌株和其突变型 Spo^{-} 菌株(不能形成芽孢)的研究发现,在洗必太、甲苯以及戊二醛存在的条件下,野生型枯草芽孢杆菌 168 菌株会形成芽孢而存活,而突变型 Spo^{-} 菌株则由于不能形成芽孢而死亡^[29-30]。当芽孢复苏时,会变得重新对消毒剂敏感^[31],因此芽孢的形成也是一种表型抗药性。

芽孢的一般结构包括芽孢核心(包括芽孢质、芽孢核区、芽孢膜和芽孢壁)、皮层、芽孢衣和胞外壁。核心由 DNA、RNA 和蛋白质等构成,还有一种重要物质——吡啶二羧酸;皮层主要由肽聚糖构成;芽孢衣是一种膜结构,为双层膜,主要由蛋白质构成^[28]。芽孢的抗性机制目前并不十分清楚,有学者发现,芽孢衣对氧化剂如过氧化氢、臭氧、过亚硝酸盐、二氧化氯和次铝酸盐具有较高的抗性,芽孢衣可以阻挡消毒剂分子进入芽孢核心^[28]。Ghosh 等^[32]发现,当丢失编码 *cotE* 和 *gerE* 两个编码芽孢衣蛋白的基因时,枯草芽孢杆菌形成孢子时丢失芽孢衣,该孢子对次铝酸盐的敏感程度与营养体的相差不大,这证明了芽孢衣在抗消毒剂性质上的作用。

3 讨论

在细菌对消毒剂的抗性中,生物被膜的形成具有重要作用,但当前的研究还不能很好地解释细菌形成生物被膜的机制,以及形成生物被膜后如何发挥抗性作用。本研究团队近几年来对副溶血性弧菌、单细胞增生李斯特氏菌等进行群体感应研究,试图从分子水平解释这些常见的重要食源性致病菌形成生物被膜的原因,这些研究为深

入研究细菌对消毒剂的抗性机理提供前期工作基础。

而对于细菌抗消毒剂抗性机制的研究,目前国内外主要对抗季胺化合物和过氧化物的研究较多,而对其他消毒剂的抗性机制研究却较少,同时这些研究的对象菌株代表性不强,不能很好地阐明实际情况下细菌对消毒剂的主要抗性机制。本研究团队正在进行全国大规模的农产食品、加工食品和饮用水中的病原菌调查,通过分子分型获得污染细菌的主要基因型,找出污染的主要菌株,今后加强消毒剂对这些菌株的抗性机理研究,不但对阐明细菌对消毒剂的抗性有重要作用,而且对控制细菌的污染具有重要的现实意义。

参 考 文 献

- [1] Russell AD. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon[J]. The Journal of Hospital Infection, 2004, 57(2): 97-104.
- [2] Craun GF, Brunkard JM, Yoder JS, et al. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2010, 23(3): 507-528.
- [3] Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2007, 51(12): 4217-4224.
- [4] Denyera SP, Stewart G. Mechanisms of action of disinfectants[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 1998, 41(3/4): 261-268.
- [5] Wei MK, Wu QP, Huang Q, et al. Plasma membrane damage to *Candida albicans* caused by Chlorine dioxide (ClO_2)[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(2): 67-73.
- [6] Zhang YQ, Wu QP, Zhang JM, et al. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2011, 111(4): 1006-1015.
- [7] 吴清平, 张永清, 张菊梅, 等. 臭氧灭菌机理及消毒副产物溴酸盐控制技术研究进展[J]. 饮料工

- 业, 2009, 12(4): 6–12.
- [8] Buckingham-Meyer K, Goeres DM, Hamilton MA. Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(2): 236–244.
- [9] Saitou K, Furuhashi K, Kawakami Y, et al. Biofilm formation abilities and disinfectant-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches captured in hospitals[J]. *Biocontrol Science*, 2009, 14(2): 65–68.
- [10] Anderson RL. Iodophor antiseptics: intrinsic microbial contamination with resistant bacteria[J]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 1989, 10(10): 443–446.
- [11] Bridier A, Briandet R, Thomas V, et al. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review[J]. *Biofouling*, 2011, 27(9): 1017–1032.
- [12] Svetlíková Z, Škovierová H, Niederweis M, et al. Role of porins in the susceptibility of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium chelonae* to aldehyde-based disinfectants and drugs[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(9): 4015–4018.
- [13] Frenzel E, Schmidt S, Niederweis M, et al. Importance of porins for biocide efficacy against *Mycobacterium smegmatis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(9): 3068–3073.
- [14] Dubois-Brissonnet F, Naïtali M, Mafu AA, et al. Induction of fatty acid composition modifications and tolerance to biocides in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by plant-derived terpenes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(3): 906–910.
- [15] Guérin-Méchin L, Dubois-Brissonnet F, Heyd B, et al. Specific variations of fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by quaternary ammonium compounds and relation with resistance to bactericidal activity[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87(5): 735–742.
- [16] Méchin L, Dubois-Brissonnet F, Heyd B, et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 to didecylmethylammonium bromide induces changes in membrane fatty acid composition and in resistance of cells[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 86(5): 859–866.
- [17] Chen YQ, Chen C, Zhang XJ, et al. Inactivation of resistant *Mycobacterium mucogenicum* in water: Chlorine resistance and mechanism analysis[J]. *Biomedical and Environmental Sciences: BES*, 2012, 25(2): 230–237.
- [18] Mc Cay PH, Ocampo-Sosa AA, Fleming GT. Effect of subinhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture[J]. *Microbiology*, 2010, 156(Pt 1): 30–38.
- [19] Abuzaid A, Hamouda A, Amyes SG. *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacΔE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance[J]. *Journal of Hospital Infection*, 2012, 81(2): 87–91.
- [20] Kümmerle N, Feucht HH, Kaulfers PM. Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, 40(10): 2276–2279.
- [21] Roca A, Rodríguez-Herva JJ, Ramos JL. Redundancy of enzymes for formaldehyde detoxification in *Pseudomonas putida*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(10): 3367–3374.
- [22] Panmanee W, Hassett DJ. Differential roles of OxyR-controlled antioxidant enzymes alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF) and catalase (KatB) in the protection of *Pseudomonas aeruginosa* against Hydrogen peroxide in biofilm vs. planktonic culture[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 295(2): 238–244.
- [23] Ceragioli M, Mols M, Moezelaar R, et al. Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of *Bacillus cereus* to various disinfectant treatments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(10): 3352–3360.
- [24] Nde CW, Toghrol F, Jang HJ, et al. Toxicogenomic response of *Mycobacterium bovis* BCG to peracetic acid and a comparative analysis of the *M. bovis* BCG response to three oxidative disinfectants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(1): 277–304.
- [25] Bjergbaek LA, Haagensen JA, Molin S, et al. Effect

- of oxygen limitation and starvation on the benzalkonium chloride susceptibility of *Escherichia coli*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(5): 1310–1317.
- [26] Stewart MH, Olson BH. Impact of growth conditions on resistance of *Klebsiella pneumoniae* to chloramines[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(8): 2649–2653.
- [27] Taylor RH, Falkinham JO 3rd, Norton CD, et al. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(4): 1702–1705.
- [28] Leggett MJ, McDonnell G, Denyer SP, et al. Bacterial spore structures and their protective role in biocide resistance[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113(3): 485–498.
- [29] Shaker LA, Dancer BN, Russell AD, et al. Emergence and development of chlorhexidine resistance during sporulation of *Bacillus subtilis* 168[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1988, 51(1): 73–76.
- [30] Power EM, Dancer BN, Russell AD. Emergence of resistance to glutaraldehyde in spores of *Bacillus subtilis* 168[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1988, 50(2a): 223–226.
- [31] Russell AD. Bacterial spores and chemical sporicidal agents[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1990, 3(2): 99–119.
- [32] Ghosh S, Setlow B, Wahome PG, et al. Characterization of spores of *Bacillus subtilis* that lack most coat layers[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(20): 6741–6748.

科技信息摘录

Nature: 中国科学院联合发表丙肝研究新成果

来自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所、哈佛大学医学院的研究人员,在新研究中解析了丙型肝炎病毒(HCV)p7 离子通道的结构。相关研究发表在 6 月 5 日的《自然》(Nature)杂志上。

HCV 是慢性肝炎的主要病原之一,每年约有 1.7 亿人受到 HIV 感染,常导致肝硬化和肝癌。HCV 的基因组含有一个长的开放阅读框架(ORF),编码一个约 3 100 个氨基酸残基(aa)组成的多蛋白,该蛋白被细胞和病毒蛋白酶切割产生至少 10 个病毒基因产物:核心蛋白(Core)、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A 和 NS5B 蛋白等。

P7 蛋白是一个介于 HCV 结构蛋白和非结构蛋白之间的小蛋白,在脂质膜中形成六聚体阳离子通道,在病毒的自然感染过程中起一定的作用。金刚烷胺和长烷基链的亚氨基糖衍生物可抑制 p7 形成的阳离子通道,对 HCV 的治疗发挥重要作用。然而在 HCV 的临床试验中,金刚烷胺衍生物的药物疗效存在着极大的差异,不了解 p7 的详细分子结构也难以对此进行解释。

在这篇文章中,研究人员利用最新的核磁共振(NMR)技术解析了 p7 蛋白以及它的药物结合位点的结构。分析结构揭示出一种不同寻常的六聚体装配模式,p7 单体 i 不仅与它们的直接相邻单体发生相互作用,还延伸结合了 i+2 和 i+3 单体,形成了一个复杂的漏斗样结构。该结构揭示了阳离子选择的机制:束紧漏斗狭窄末端的一个天冬酰胺/组氨酸环充当了广泛的阳离子选择过滤器,而定位于漏斗宽末端的一个精氨酸/赖氨酸环则选择性地让阳离子进入到通道中。

研究人员利用全细胞通道记录方法进行功能研究,证实这些残基对于通道活性至关重要。NMR 检测通道-药物复合物揭示,周边螺旋和成孔螺旋之间的六价疏水口袋是金刚烷胺或衍生物的结合位点,化合物特异性结合这一位点有可能导致其构象改变,通过阻止通道开放抑制了阳离子传导。

这些研究结果为 p7 介导的阳离子传导以及金刚烷胺衍生物对它的抑制作用提供了合理的分子解释。

——摘自《中国生物技术信息网》2013/6/26
<http://www.biotech.org.cn/information/108517>