化学消毒剂作用机理研究进展

吴清平[1]　韦明肯[1,2,3]　吴军林[1,3]　阙绍辉[4]

(广东省微生物研究所广东省菌种保藏与应用重点实验室　广州　510070)[1]
(广西玉林师范学院化学与生物系　玉林　537000)[2]　(中国科学院南海海洋研究所　广州　510301)[3]
(广东环凯微生物科技有限公司　广州　510070)[4]

摘要：细胞壁的屏障作用是微生物降低对消毒剂敏感性的普遍机制。消毒剂对细胞膜的作用导致膜的通透性增加，胞内物质泄漏，呼吸链被破坏等。一些消毒剂能直接改变、破坏蛋白质和核酸的结构和功能，但核酸和蛋白质的合成过程可能比结构本身对消毒剂更加敏感。流式细胞仪、单细胞凝胶电泳等新技术的应用将使人们能够更深刻地了解消毒剂的作用机理。

关键词：化学消毒剂，作用机理，细胞膜，蛋白质，核酸
中图分类号：Q93　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2654 (2006) 06-0117-05

Advance in Action Mode of Chemical Disinfectants

WU Qing-Ping[1]　WEI Ming-Ken[1,2,3]　WU Jun-Lin[1,3]　QUE Shao-Hui[4]

(*Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou* 510070)[1]
(*Guangxi Yulin Normal College, Yulin* 537000)[2]
(*South China Sea Institute of Oceanology, Guangzhou*510301)[3]
(*Guangdong Huankai Microbiological Science and Technology Co. Ltd, Guangzhou* 510070)[4]

Abstract: Cell membranes play an important role in resistance of microorganisms to chemical disinfectants. The effects of disinfectants on cell membranes include the alteration of permeability, leakage of intracellular substances, damaging the respiration chains and so on. Though the structures and functions of proteins and DNA altered by some disinfectants, the synthetical processes of them seemed to be more sensitive. Flow cytometry (FCM) and single-cell gel electrophoresis (SCGE) are promising technology which should benefit the investigation of action mode of chemical disinfectants.

Key words: Chemical disinfectants, Action mode, Cell membrane, Protein, Nucleic acid

近年来，开发应用于消毒的化学物质单体及其复配制剂不断增多。由于微生物对消毒剂抗药性日益严重以及人们健康环保意识的不断增强，开发高效低毒的消毒剂产品是未来的发展趋势，因此，须从机理上去阐明各种消毒剂对微生物的致死作用。国内外研究者从细胞壁、细胞膜、细胞质、核酸以及细胞的物质能量代谢等不同层面和角度进行消毒机理的研究，取得了相当的进展。

1　消毒剂对微生物细胞壁的作用

细胞壁的屏障作用是微生物降低对药物敏感性的普遍机制，特别是分支杆菌、革

通讯作者　Tel：020-87688132 (87680942)，E-mail：wuqp@gdas.ac.cn
收稿日期：2006-01-12，**修回日期**：2006-02-28

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

兰氏阴性细菌及芽孢。具体而言，细菌细胞壁中的肽聚糖，真菌的葡聚糖、甘露聚糖，芽孢外壁中的吡啶二羧酸，分支杆菌中分枝酸的含量等都对消毒剂的吸收和透过具有重要影响，甚至培养基的构成也会影响到微生物对消毒剂的敏感性[1]。Fraud 等人的研究表明，分支杆菌的原生质体对邻苯二甲醛、戊二醛及双氯双胍乙酸的敏感性均比非原生质体显著增强，可能是失去细胞壁后细胞表面的疏水性下降所致[2]。Hiom 等人发现酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）细胞壁的厚度、孔密度及葡聚糖含量影响其对双氯双胍己烷（Chlorhexidine，CHX）的敏感性，但与甘露聚糖的含量无关。随着细胞壁的孔密度降低或厚度增大，细胞对 CHX 的吸收量下降[3]。通常认为消毒剂是以被动扩散的方式经过葡萄球菌的细胞壁，对于其它革兰氏阳性菌则所知甚少。革兰氏阴性菌的细胞壁外层为脂多糖、磷脂和脂蛋白组成的外膜，亲水性和亲脂性消毒剂分别由外膜上的亲水性和亲脂性孔道进入。阳离子消毒剂可通过对外膜的破坏而使自身的被动吸收量提高，如双胍类、季铵盐类等。

细菌芽孢的外壁因富含吡啶二羧酸而难以被杀灭。研究发现枯草芽孢杆菌营养细胞对戊二醛的吸收量大于萌发中的芽孢，而休眠的芽孢其吸收量最小。另外，氯比碘更能有效杀死枯草芽孢杆菌的芽孢，可能是因为该芽孢对氯的吸收比对碘的吸收快。虽然很少有消毒剂把真菌细胞壁作为主要的作用靶点，但几丁质是一个潜在的交联剂（甲醛和戊二醛）作用位点。

2 消毒剂对微生物细胞膜及胞内物质的作用

细胞膜在维持微生物的正常生命活动中具有非常重要的地位。对于细菌而言，细胞膜不仅保持胞内物质与外界的隔离性，而且是物质与能量代谢的场所。消毒剂对细胞膜作用的表现为膜的通透性增加，胞内物质泄漏，呼吸链被破坏，ATP 的合成减少或停止，糖酵解终止等。这些作用均可导致细菌的死亡。

2.1 对膜的作用 生物的细胞膜主要由磷脂双分子层和蛋白质构成，两者都可以成为消毒剂分子作用的目标。双胍类和季铵盐类一般是以膜上的磷脂分子作为作用靶标而造成各种微生物细胞膜的损伤。多聚双胍类使大肠杆菌（*Escherichia coli*）的内膜产生脂相分离和产生酸性磷脂。过氧化氢产生的羟自由基能氧化酶和蛋白的巯基，也常常攻击细胞膜上的不饱和脂肪酸（当然还有其它作用）。通常，很多消毒剂都能与蛋白质和酶上的巯基发生作用，使膜蛋白受到破坏。

K^+ 泄漏是膜受到损伤的直接证据之一[4]。K^+ 非常迅速地从受损细胞中释放出来，并且可以方便地用原子吸收分光光度计、K^+ 选择性电极、电感耦合等离子质谱仪等检测，已有多种消毒剂作用于微生物导致 K^+ 泄漏的报道。

原生质体裂解作用是确认消毒剂对细胞膜损伤作用的另一个好方法。相对“正常”细胞，原生质体受到消毒剂攻击时更容易裂解。不同消毒剂对同一种原生质体破坏程度不同，同一种消毒剂对不同种原生质体的作用程度也有差异。Caroline 发现 Polyquaternium－1（PQ－1，一种季铵盐类化合物）能有限破坏粘质沙雷氏菌（*Serratia marcescens*）的细胞膜，但不能裂解白色念珠菌（*Candida albicans*）的原生质体，Myristamidopropyl dimethylamine（MAPD，一种氨基胺）也只能导致白色念珠菌部分裂解；但 PQ－1 和 MAPD 都能杀灭白色念珠菌，且都能导致 K^+ 泄漏。也许它们对膜的损伤只导致 K^+ 的泄漏而没有达到使原生质体裂解的程度。但 PQ－1 和 MAPD 都能很好地裂解粘

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

质沙雷氏菌的原生质体。由此看来有些消毒剂对膜的损伤很有限[5]。

此外，测定 ATP、磷酸盐的泄漏，以及细胞对某些物质的吸收速率也是证明膜受损的有效方法。但是，对膜损伤的研究不应仅仅停留在测定胞内物质泄漏以及外膜裂解的层面上。特别是真核生物，其内膜体系与生命的关键代谢戚戚相关，研究消毒剂如何作用于真核生物的内膜系统，将使我们能够更深入地了解真核生物的消毒机理。

2.2　对代谢的影响　维持生命活动的重要代谢活动包括糖酵解、三羧酸循环、呼吸链（电子传递链）、氧化磷酸化（ATP 的生成）、核酸和蛋白质的合成等。这几个重要代谢活动中的任何一个被终止都可能导致生命活动的停止。物质能量代谢成为研究消毒机理更为深层次的问题。

膜的完整性受到破坏后，其通透性增加，胞内的物质会往外泄漏，这其中包括代谢中间产物及催化有关反应的酶。Iwami[6] 的研究显示，洗必泰作用后链球菌突变体 NCIB11723 的糖酵解速率下降，但这种下降主要是由于酵解中间产物的泄漏引起的。

呼吸被抑制的重要标志是 ATP 合成量的减少。原核生物的呼吸链位于细胞膜上，消毒剂与膜的接触可破坏呼吸链，导致 ATP 合成下降或受阻，造成细胞死亡。Dinning 等[7] 用虫荧光素－虫荧光素酶生物发光法测定并发现亚抑制浓度的羟基吡啶硫酮就能使胞内 ATP 水平大幅度下降。刘雪林等发现二氧化氯作用 30s 后大肠杆菌的 ATP 酶活性下降显著。

Williams[8] 发现 3－氯－4，4－二甲基－2－噁唑烷酮和 1，3－二氯－4，4，5，5－四甲基－2－咪唑烷酮对金黄色葡萄球菌的 K^+ 泄漏和 H^+ 通透性增加作用不大，但细胞的耗氧量减少，可见抑制呼吸酶是这两种抑菌剂作用的第一步，并最终会导致微生物失活。

目前对呼吸抑制作用的证据主要是氧消耗（或吸收）的减少或 ATP 合成水平下降等间接指标。但消毒剂具体作用在呼吸链上的哪一个环节或哪一种酶还难以确定，也许是这些酶难以分离纯化阻碍了这方面的研究。真核生物的呼吸链位于线粒体内膜上，其呼吸链与消毒剂接触的难度比原核生物大，因此消毒剂对它的能量代谢的作用机制可能更复杂些。

脂肪酸含量变化也被用来分析消毒剂的作用机理。Triclosan 是一种膜作用剂，但研究显示其对于金黄色葡萄球菌和大肠杆菌及其它细菌的生长抑制作用主要是因为依赖于 NADH 的脂酰－ACP 转移还原酶被抑制，造成脂肪酸合成被停止。刘雪林发现大肠杆菌被二氧化氯杀灭与脂质被氧化有关。另外，碘类消毒剂、过氧乙酸等也对细胞膜上的脂肪酸发生作用。

用同位素标记法研究消毒剂对蛋白质及核酸合成的影响也是一个重要的研究方法。Viktor[9] 用 ^{14}C－Adenine 和 ^{14}C－Leucine 作为合成前体测定了 16 种季铵盐类消毒剂对阴沟肠杆菌（*Enterobacter cloacae*）的蛋白质及 DNA 合成的影响，发现有 15 种消毒剂的 DNA 合成的 IC_{50} 小于蛋白质合成的 IC_{50}，其中 7 种消毒剂主要作用于 DNA 的合成。似乎阴沟肠杆菌 DNA 合成比蛋白质合成更容易受季铵盐类消毒剂的影响。也有人用同位素掺入法研究了二氧化氯对蛋白质合成的影响。

病毒的外壳蛋白（capsid protein）一直是研究病毒消杀机理的一个热点。消毒剂与病毒外壳的作用方式与强度因消毒剂和病毒的种类而异。总体而言，有包膜病毒比裸病毒对消毒剂更敏感。多数化学消毒剂对有包膜病毒几乎都有效，但季铵盐类、洗必

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

泰、戊二醛对裸病毒的杀灭效果都不甚理想。有研究显示，病毒基因组不是戊二醛作用的理想位点，戊二醛主要与病毒外壳上的氨基酸发生交联作用，特别是与赖氨酸上的 ε-氨基发生交联。Martine[10]证明了戊二醛对肠病毒的毒力与病毒 VP1 外壳蛋白上的赖氨酸残基的排列顺序有关，而与其总数目没有明显相关性。

3 消毒剂对核酸的作用

核酸位于细胞的内部，真核生物的核酸还有核膜包被，因此核酸可能是消毒剂最后到达的位点之一。芬顿反应（Fenton reaction）是一个能产生羟自由基的反应体系（$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$），常被应用于羟自由基对 DNA 损伤的胞外研究。胞外的 DNA 损伤试验为研究胞内的 DNA 损伤提供了有益的信息[11]。质粒 pSV2neo 在芬顿反应处理后，透射电镜显示其损伤包括形成缺口环状分子、线状分子、单链噜噗（loop）结构和质粒聚合物等[12]。戊二醛似乎对枯草芽孢杆菌芽孢的 DNA 没有损伤作用。陈春田发现二氧化氯可导致大肠杆菌 DNA 漏出，但漏出率与杀灭率不成比例。

含氯消毒剂对细菌 DNA 毒性包括形成含氯的核苷酸碱基衍生物，2.6mg/L 的次氯酸作用 5min 能彻底抑制大肠杆菌的生长，对 DNA 合成的抑制率为 96%，而对蛋白质合成的抑制率仅为 10% ~50%，因此推断 DNA 合成是对该消毒剂的更为敏感的环节。含氯消毒剂具有杀病毒活性，Olivieri 发现氯（chlorine）对 f2 噬菌体裸露 RNA 及完整衣壳内的 RNA 有同等的损伤效果，但其外壳蛋白仍然能够进入宿主；Taylor 和 Butler 发现 1 型脊髓灰质炎病毒（Poliovirus type 1）的 RNA 在病毒外壳形态发生明显改变之前即被降解成 RNA 片段；但 Floyed 和 O'Brien 证实脊髓灰质炎病毒的衣壳也能被严重损坏。此种矛盾结果尚需进一步研究澄清。

基因组核酸不是戊二醛作用的理想靶点。对噬菌体 F116 的研究发现，经戊二醛预处理后的噬菌体颗粒仍有感染铜绿假单胞菌的能力。在病毒 SV40 中，只有戊二醛、甲醛等能引发蛋白质 - DNA 交联的醛类，才能抑制 DNA 的合成。

辛忠涛等[13]研究氯及二氧化氯对甲肝病毒（HAV）的灭活作用表明，病毒在抗原被破坏前已失活，推测可能是核酸遭到了损伤。李君文等[14]用 RT-PCR 步移法及 ELISA 法证实了前者的推测：在氯或二氧化氯的作用下，HAV 病毒的感染性丧失与 5' 端非编码区约 600bp 的 RNA 片段被破坏有关。

4 展望

由于消毒剂公认的多靶点作用性，也由于微生物是一个构成复杂的庞大群体，其细胞组成千差万别，个体极其微小，要确切了解消毒剂对它们的作用机理，其难度不小。只有联合运用生物、化学及物理的方法才能获得比较满意的结果。比如，消毒剂对核酸的作用总体来说研究得还不够深入。特别是在细菌和真菌的研究方面，很多研究者还仅仅停留在通过消杀液 OD_{260} 的变化来推测核酸是否受损。实际上即使核酸受损也不一定释放到胞外；也未见有从 OD_{260} 增高的消杀液中提取到核酸的报道。更深入、细致的研究必须不断地采用新的设备、方法和技术。近二十年来细胞学研究方面的一些新技术，如流式细胞仪（Flow cytometry），单细胞凝胶电泳（Single-cell gel electrophoresis）等，使得人们可以在单细胞水平上探测细胞的死活、膜受损、核酸含量变化以及 DNA 的断裂、损伤等，弥补了以往群体水平研究的不足[15,16]。已有人尝试将这些

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

技术用于抗菌肽作用机理的研究，相信在化学消毒机理方面亦可借鉴。

目前的消毒机理主要是以病毒和细菌为材料，关于真核微生物的研究则鲜有报道。但真核微生物是重要的病原菌之一，鉴于其细胞结构不同于病毒和细菌，对其进行专门的消毒机理研究具有理论和实践意义。

总之，人们应从微生物的细胞膜、细胞壁、细胞器、蛋白质、核酸以及细胞的物质能量代谢等方面进行多层面的研究，力争阐明特定消毒剂在某种（类）微生物上的首要靶点，对于可以致 DNA 损伤的消毒剂，则应阐明这种损伤在致死中的作用。另外，弄清消毒剂在低浓度和高浓度下作用机理的异同也很重要。

参 考 文 献

[1] Corinne L D, Jean P D, Antoine M, *et al*. Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 1025 ~ 1032.
[2] Fraud S, Hann A, Maillard J, *et al*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, **51**: 575 ~ 584.
[3] Hiom S J, Furr J R, Russell A D, *et al*. Cytobios, 1996, **86** (345): 123 ~ 135.
[4] Yoshiro I, Akiko S, Toshiko H, *et al*. FEMS Microbiology Letters, 2004, **237**: 325 ~ 331.
[5] Caroline E C, Jean-Yves M, Russell A D. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2003, **51**: 1153 ~ 1158.
[6] Iwami Y, Schachtele C F, Yamada T. Oral Microbiol Immunol, 1995, **10** (6): 360 ~ 364.
[7] Dinning A A, Eastwood, Austin C. J Appl Microbiol, 1998, **85**: 141 .
[8] Williams D E, Swango L J, Wilt G R, *et al*. Appl Environ Microbiol, 1991, **57** (4): 1121 ~ 1127.
[9] Viktor M, Lubica M. International Journal of Antimicrobial Agents. 1999, **11**: 59 ~ 64.
[10] Martine C, Christine A, Jean-Luc B, *et al*. Appl Environ Microbiol, 2004, **70**: 1717 ~ 1722.
[11] Shapiro M P, Setlow B, Setlow P. Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70** (4): 2535 ~ 2539.
[12] Chaudhuri S, Bhattacharyya N P, Bhattacharjee S B. Journal of Electron Microscopy, 1992, **41** (1): 57 ~ 59.
[13] 辛忠涛，李君文，王新为，等. 卫生研究，2002，**31** (1)：15 ~ 17.
[14] 李君文，辛忠涛，王新为，等. 中国消毒学杂志，2003，**20** (1)：1 ~ 5.
[15] Park Y, Hahm J S, Hahm K S. Protein Pept Lett, 2006, **13** (1): 53 ~ 58.
[16] Arabski M, Klupinska G, Chojnacki, J, *et al*. Mutat Res, 2005, **570** (1): 129 ~ 135.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn