

工业腐败微生物种属特性及抗药性分析

陈艺彩 谢小保 施庆珊 欧阳友生* 陈仪本

(广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东省微生物应用新技术公共实验室 广东 广州 510070)

摘要: 为科学治理工业领域中微生物对杀菌剂的抗药性,从工业产品、原料及水样中采集腐败微生物,细菌按照《常见细菌系统鉴定手册》、API 鉴定系统及 16S rDNA 序列分析,真菌按《真菌鉴定手册》及 18S rDNA 序列分析分别进行鉴定;通过测定杀菌剂的最小抑制浓度(MIC)来评估微生物抗药性水平。结果显示,腐败微生物中革兰氏阴性细菌约占 46.91%,主要包括假单胞菌属、肠杆菌属、气单胞菌属、克雷伯氏菌属等;革兰氏阳性菌约占 32.71%,主要种属为芽孢杆菌属、微杆菌属、李斯特氏菌属及球菌等;真菌约占 12%,主要包括青霉属、木霉属和曲霉属。MIC 测试结果显示,主要抗药性微生物为假单胞菌属,约占 33.78%,平均抗性水平达到 36 mg/L,且传代不稳定。结论认为,工业上微生物污染主要由细菌耐药性引起,细胞膜结构及细菌生物膜的形成在该类杀菌剂抗药性产生的过程中起重要作用。

关键词: 微生物抗药性,工业杀菌剂,最小抑制浓度

Species Identification of Industry Spoilage Microorganism and the Resistance Analysis

CHEN Yi-Cai XIE Xiao-Bao SHI Qing-Shan OUYANG You-Sheng*
CHEN Yi-Ben

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

Abstract: In the aim of preventive microorganism resistance to industrial biocides, a collection of microorganism which isolated from industry production and raw material were gathered. To characterize bacteria species according to Manual of Systematic and Determinative Bacteriology, API Identification System, 16S rDNA genes analysis, and fungus according to Manual for the Identificati of Fungi, 18S rDNA genes analysis, respectively. The minimum inhibitory concentrations for biocides were determined to estimate the microorganisms resistance. It was found that the majority of isolates in the collection were Gram-negative bacteria (46.91%) including genera *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella* and *Burkholderia*. The dominant strains of Gram-positive bacteria (32.71%) were genera *Bacillus*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Listeria* along with several *coccus*. And fungi (12%) were *Aspergillus*, *Trichoderma* and *Penicillium*. The value of MICs showed that main resistant species is *Pseudomonas*

(33.78%), its average level of resistance was up to 36 mg/L and the resistance of stability was weak with subculture. The result indicated that one of the considerable reasons of biological pollution in industry was the microorganism tolerance and the nature of the membrane structure and the biofilm formation of bacteria probably played a important role in the formation of microorganism resistance.

Keywords: Microorganism resistance, Biocide, Minimum inhibitory concentration

许多工业产品及原料如胶黏剂、涂料、皮革、轻纺、造纸、化妆品、清洗剂、饲料、循环用水等领域, 因为长期大量使用杀菌剂而导致微生物抗性产生^[1], 给工业生产和生活带来巨大损失。其中异噻唑啉酮及其衍生物是近些年来工业应用最广泛、抗药性问题也极为突出的杀菌剂之一。异噻唑啉酮属于杂环类有机化合物, 其衍生物主要有 2-甲基异噻唑啉酮(MIT)、5-氯-2-甲基异噻唑啉酮(CMIT)、苯并异噻唑啉酮(BIT)、正辛基异噻唑啉酮(OIT)及二氯正辛基异噻唑啉酮(DCOIT)等^[2]。杀菌剂使用环境的差异, 使得污染微生物的种类也不尽相同, 给抗药性治理工作带来了很大不便。因此搜集工业领域污染的微生物, 进行种属分布和抗药性水平的分析, 是进行工业杀菌剂抗药性防治的基础和首要工作, 也为微生物抗药性机理的研究提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源: 2007–2009 年间从华南、华中等地区, 包括广州、深圳、东莞、佛山、江门、浙江、上海、福州、河南、西安等城市, 使用异噻唑啉酮及其衍生物类化合物作为杀菌剂的化工厂和日化企业中搜集腐败变质的样品、原材料、生产处理用水等。

1.1.2 样品种类: 工业类产品包括胶黏剂、涂料、乳胶漆、白乳胶、107 胶、消泡剂、硅溶胶日化用品(洗手液、弹力素、洗洁精)等; 原材料类包括高岭土、淀粉水、淀粉、PVA 等, 生产用水类包括造纸处理白水、循环热水、洗桶水、纸厂污水、网下白水等。

1.1.3 标准菌株: 大肠杆菌(ATCC8099), 铜绿假单胞菌(ATCC9027), 枯草芽孢杆菌(ATCC6633), 黑曲霉(ATCC16404)。

1.1.4 杀菌剂: 广东迪美公司供应的高纯度杀菌剂 MIT、BIT 和卡松(Kathon)。

1.1.5 培养基: 基础盐离子培养基(ME)、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)。各种生化试验培养基参见《微生物培养基的制造与应用》^[3]。

1.2 方 法

1.2.1 污染微生物的分离纯化及保存: 根据污染样品的不同性状, 用无菌水梯度稀释后, 分成几等分涂布在 TSA、PDA 培养基上, 或与培养基混匀后倒板。在 30°C 恒温培养 2–5 d。挑取不同形态的细菌单菌落进行划线分离并用甘油管保存。挑取真菌的孢子用平板纯化培养并用斜面保存。

1.2.2 菌株生化鉴定: 细菌鉴定按照《常见细菌系统鉴定手册》^[4], 真菌鉴定按《真菌鉴定手册》^[5]进行初步鉴定。部分细菌用 API 鉴定系统进行鉴定。

1.2.3 菌株分子生物学鉴定^[6]: 参照《现代分子生物学实验技术》中的方法分别提取总 DNA, 用 16S rDNA 及 18S rDNA 的通用引物进行 PCR 序列扩增, 测序后在 NCBI 上进行序列比对(BLAST)分析。细菌通用引物序列为 F27: 5'-AGAGTTTGATCA TGGCTCAG-3'; R1541: 5'-AAGGAGGTGATCCAG CCGCA-3', 真菌通用引物为 FR1: 5'-CTCTCAATC TGTC AATCCTTATT-3'; FF2: 5'-GGTTCTATTTTGT TGGTTTCT-3'。

1.2.4 微生物抗药性评价: 肠杆菌属、假单胞菌属、芽孢杆菌属及丝状真菌分别以大肠杆菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉为对照菌株, 选择 ME 培养基, 用平板稀释法测定腐败微生物的最小抑制浓度(MIC), 测试菌株的 MIC 值高于对照菌株 2 倍以上时标记为抗药性菌株。

1.2.5 细菌抗药性稳定性测定: 将待测细菌在新鲜的 ME 液体培养中连续传代 10 次(接种量为 1%, 30°C, 200 r/min 培养 24 h 为 1 代), 用试管稀释法测定杀菌剂对每代培养物的 MIC 值。

1.2.6 铜绿假单胞菌标准菌株的抗药性诱导: 测定 Kathon 对标准菌株的 MIC 值(标记为 MIC⁰)。将标准菌株接种至含有 1/4MIC⁰ 杀菌剂的 100 mL ME 液

体培养基中, 200 r/min、30°C 恒温培养 24 h 后(第 1 代诱导物), 取其中一份诱导物用试管稀释法测定其 MIC 值, 待新的 MIC 值(标记为 MIC¹)确定后, 将剩余诱导物接种至含有 1/4MIC¹ 杀菌剂的新的 ME 液体培养基中, 200 r/min、30°C 恒温培养 24 h (第 2 代诱导物), 测定其 MIC 值(标记为 MIC²), 并继续用含 1/4 MIC² 杀菌剂的培养基诱导培养。该过程重复 10 次。

2 结果与分析

2.1 污染微生物类群的种属分布

从污染的腐败样品和原料中搜集到 162 株腐败微生物, 其中 143 株细菌(芽孢杆菌 48 株, 球菌 7 株), 19 株真菌(丝状真菌 18 株, 酵母 1 株)。微生物的种属分布结果见表 1、2。从表 1 中可以看出, 导致异噻唑啉酮类杀菌剂失效的腐败微生物主要是革兰氏阴性细菌(G⁻), 占总数的 46.91%, 其次为革兰氏阳性菌(G⁺)和丝状真菌, 分别占总数的 32.71% 和 11.11%。放线菌(*Actinomycetes*)和酵母菌(*Yeast*)的污染比较少见。

假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.) 占总腐败微生物的 17.9%, 其中包括恶臭假单胞菌(*P. putida*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)等; 其次为肠杆菌属(*Enterobacter*)和霉菌(*Fungi*), 都占 11.11%。分离到的霉菌主要有曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)和青霉属(*Penicillium*), 曲霉包括烟曲霉(*A. fumigatus*)、棒曲霉(*A. clavatus*)等。其他腐败微生物还包括革兰氏阴性的气单胞菌属(*Aeromonas*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)以及革兰氏阳性的微杆菌属(*Microbacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、李斯特氏菌属(*Listeria*)及球菌包括葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和微球菌属(*Micrococcus*)等。

腐败微生物中主要种属为芽孢杆菌属(*Bacillus*), 共 44 株, 约占细菌总量的 29.63%, 属内各种的分布见表 2, 其中坚强芽孢杆菌(*B. firmus*)占总比例的 25%, 是主要的芽孢杆菌污染菌种, 其次为蜡样芽孢菌(*B. cereus*)和枯草芽孢菌(*B. subtilis*)。

表 1 工业腐败微生物的种属分布情况

| Table 1 | | The species of industry spoilage microorganism | | | | |
|--------------------------|----------------|--|------------------|-------------------------------|----|-------|
| | | 种属分布 | 株数 | 百分比 | | |
| | | Species | Number of strain | Percentage (%) | | |
| 细菌 Bacteria | G ⁻ | 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> | 29 | 17.90 | | |
| | | 肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> | 18 | 11.11 | | |
| | | 芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> | 10 | 6.17 | | |
| | | 气单胞菌 <i>Aeromonas</i> | 8 | 4.94 | | |
| | | 克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i> | 5 | 3.09 | | |
| | | 黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> | 3 | 1.85 | | |
| | | 黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i> | 2 | 1.23 | | |
| | | 伯克霍尔德氏菌属 <i>Burkholderia</i> | 1 | 0.62 | | |
| | | ----- | | | | |
| | | 真菌 Fungi | G ⁺ | 微杆菌属 <i>Microbacterium</i> | 4 | 2.47 |
| | | | | 节杆菌属 <i>Arthrobacter</i> | 1 | 0.62 |
| | | | | 李斯特氏菌属 <i>Listeria</i> | 3 | 1.85 |
| | | | | 芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> | 38 | 23.45 |
| | | | | 球菌 <i>Coccus</i> | 7 | 4.32 |
| ----- | | | | | | |
| 曲霉 <i>Aspergillus</i> | 6 | | | 3.70 | | |
| 青霉 <i>Penicillium</i> | 5 | | | 3.09 | | |
| 木霉 <i>Trichoderma</i> | 6 | | | 3.70 | | |
| 酵母 <i>Yeast</i> | 1 | | | 0.62 | | |
| 无结果种属 No result | 14 | 8.64 | | | | |
| ----- | | | | | | |
| 总数 Total | | 162 | / | | | |

注: G⁺: 革兰氏阳性细菌; G⁻: 革兰氏阴性细菌; 无结果: 经过生理生化及分子鉴定仍未能确定其种属的菌株。

Note: G⁺: Gram positive bacteria; G⁻: Gram negative bacteria; No result: The species which were no identified results by physiological and biochemical and molecular biology technology.

2.2 不同工业领域中腐败微生物的种属特征

不同领域中的腐败微生物种属分布见表 3, 工业产品如胶黏剂、涂料、白乳胶、日化用品等主要污染微生物为细菌, 如假单胞菌属、芽孢菌属、气单胞菌属和球菌等, 而原料和工业用水的污染物除了细菌外, 包括丝状真菌。淀粉类原料主要污染微生物为肠杆菌属、假单胞菌属、木霉属及青霉属。高岭土类原料主要的污染源为曲霉属, 而白水废液类污染源为芽孢菌属、假单胞菌属和克雷伯氏菌属。

表 2 芽孢杆菌属内腐败菌株分布
Table 2 The spoilage strains of *Bacillus*

| 菌株 Strain | 数量 Number | 百分比 Percentage (%) |
|-----------------------------------|--------------|-----------------------|
| 多粘芽孢杆菌 <i>B. polymyxa</i> | 1 | 2.27 |
| 短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i> | 4 | 9.09 |
| 环状芽孢杆菌 <i>B. circulans</i> | 3 | 6.82 |
| 巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i> | 5 | 11.37 |
| 蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> | 8 | 18.19 |
| 坚强芽孢杆菌 <i>B. firmus</i> | 11 | 25.00 |
| 枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> | 6 | 13.63 |
| 地衣芽孢杆菌 <i>B. licheniformis</i> | 6 | 13.63 |
| 总数 Total | 44 | / |

注: 其中 4 株芽孢杆菌无鉴定结果, 表中未作统计。

Note: Table show without four no result identify strains of *Bacillus*.

2.3 腐败微生物的抗药性水平

根据抗药性菌株测定评价方法, 共获得抗药性菌株 74 株。结果如表 4 所示。假单胞菌属为主要的抗药性微生物, 约占总抗药性菌群的 33.78%, 其次为芽孢杆菌属和肠杆菌, 分别占总数的 20.27% 和 13.51%, 其余分别为气单胞菌属和球菌皆占总数的 6.76%。丝状真菌的抗性菌株占总数的 6.75%, 包括木霉、青霉和曲霉。从抗药性水平上来看, 丝状真

菌的抗药性水平最高, 其中木霉对 BIT、MIT、Kathon 的平均 MIC 值分别达到 90、80、90 mg/L。曲霉和青霉的抗性水平略低于木霉。细菌中假单胞菌属的抗药性水平最高, 对 BIT、MIT、Kathon 的 MIC 值分别达到 36、24、19 mg/L。其余按照抗性平均水平依次排列为肠杆菌属、气单胞菌属、黄杆菌属、微杆菌属、球菌属和芽孢杆菌属。

图 1 显示了所有腐败分离株在 3 种杀菌剂的作用下的存活率及各抗药性菌株(主要包括 6 个属)所占的比例。通过对比发现, 在起始的浓度下, 芽孢菌分离株占绝对优势(约 20%), 当杀菌剂浓度逐渐升高达到 15 mg/L 时, 芽孢菌分离株的存活率急剧下降(约 8%), 当浓度大于 20 mg/L, 芽孢菌几乎全部不能生长。气单胞菌、球菌和肠杆菌对杀菌剂的抗药性趋势一致, 随着杀菌剂浓度的逐渐增加, 存活量按比例减少。假单胞菌与其余各属细菌相比对杀菌剂的抗药性水平明显偏高, 且比例相对稳定。其中当 BIT 浓度为 50 mg/L 时仍有部分菌株存活, 对同样浓度的 MIT 和 Kathon 其存活率明显偏低。引人瞩目的是霉菌的抗性, 在杀菌剂浓度低于 70 mg/L 时其存活率基本不受杀菌剂浓度的影响, 之后随着浓度的逐渐升高开始被抑制, 在 95 mg/L 时被完全抑制。通过对比 3 种杀菌剂作用下微生物的存活量, 发现各属的分离株对 Kathon 的抗性明显低于其余 2 种杀菌剂。

表 3 不同来源污染样品中腐败微生物的种属分布表
Table 3 The species of microorganism in different kinds of spoilage sample

| | | En | Ps | Ba | Co | Ae | T | A | P | Others | Total | Percentage (%) |
|--------------------------|-----------------------|----|----|----|----|----|---|---|---|--------|-------|----------------|
| 产品 Product | 胶黏剂 Adhesives | 3 | 11 | 12 | 4 | 4 | / | / | / | 8 | 42 | 28.38 |
| | 涂料 Paint | 3 | 3 | 2 | 1 | 1 | / | / | / | 2 | 12 | 8.11 |
| 原料 Material | 白乳胶 White latex | 4 | 2 | 15 | / | / | / | / | / | 1 | 22 | 14.86 |
| | 日化用品 Daily product | / | 1 | 3 | 1 | 1 | / | / | / | 1 | 6 | 4.05 |
| | 热熔胶 Hotmelt | 2 | 5 | 7 | / | / | / | / | / | 1 | 17 | 11.49 |
| | 淀粉水 Starch water | 5 | 2 | 1 | / | / | 4 | 3 | 4 | 2 | 21 | 14.19 |
| 工业用水 Industrial water | 高岭土类 Kaolin Soil | / | / | 1 | / | 1 | 1 | 2 | / | 2 | 7 | 4.73 |
| | 循环水 Cooling-water | / | 2 | 1 | / | / | / | / | / | 1 | 4 | 2.71 |
| | 白水废水 Waste water | 1 | 3 | 3 | / | / | / | 1 | 1 | 4 | 13 | 8.78 |
| 其他 Others | / | / | 2 | 1 | 1 | / | / | / | / | 4 | 2.71 | |

注: En: 肠杆菌属, Ps: 假单胞菌属, Ba: 芽孢杆菌属, Co: 球菌属, Ae: 气单胞菌属, T: 木霉属, A: 曲霉属, P: 青霉属。

Note: En: *Enterobacter*; Ps: *Pseudomonas*; Ba: *Bacillus*; Co: *Coccus*; Ae: *Aeromonas*; T: *Trichoderma*; A: *Aspergillus*; P: *Penicillium*.

表4 抗药性微生物的种属分布及平均抗药性水平
Table 4 The species of resistance microorganism and the resistance level

| 种属 Species of resistance microorganism | | | 株数 Number | 比例 Percentage (%) | MIC (mg/L) | | | |
|---|---------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------------------|------------|----------|----------|----------|
| | | | | | BIT | MIT | Kathon | |
| 细菌 Bacteria | G ⁻ | 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> | 25 | 33.78 | 36 ± 2.6 | 24 ± 1.0 | 19 ± 0.5 | |
| | | 肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> | 10 | 13.51 | 31 ± 1.3 | 18 ± 0.4 | 18 ± 1.5 | |
| | | 气单胞菌属 <i>Aeromonas</i> | 5 | 6.76 | 25 ± 1.0 | 23 ± 0.6 | 14 ± 0.3 | |
| | | 克雷伯氏菌属 <i>Klebsiella</i> | 2 | 2.70 | 14 ± 0.5 | 15 ± 1.0 | 10 ± 0.2 | |
| | | 黄杆菌 <i>Flavobacterium</i> | 3 | 4.05 | 28 ± 1.2 | 25 ± 1.6 | 12 ± 0.3 | |
| | G ⁺ | 芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> | 15 | 20.27 | 10 ± 0.4 | 14 ± 0.1 | 15 ± 0.2 | |
| | | 微杆菌属 <i>Microbacterium</i> | 4 | 5.41 | 17 ± 0.2 | 22 ± 0.1 | 16 ± 0.1 | |
| | | 球菌 <i>Coccus</i> | 5 | 6.76 | 28 ± 0.5 | 13 ± 0.1 | 10 ± 0.3 | |
| | | 真菌 Fungi | 木霉属 <i>Trichoderma</i> | 2 | 2.70 | 90 ± 1.8 | 80 ± 2.0 | 90 ± 1.5 |
| | | 青霉属 <i>Penicillium</i> | 1 | 1.35 | 75 ± 2.0 | 80 ± 1.9 | 60 ± 0.5 | |
| | 曲霉属 <i>Aspergillus</i> | 2 | 2.70 | 90 ± 2.3 | 75 ± 2.1 | 80 ± 1.0 | | |
| 总数 Total | | 74 | | | | | | |

注:表中MIC值为3次平行测试的平均值。

Note: The MIC value is the average value of parallel test.

图2为Kathon对铜绿假单胞菌株MIC的传代稳定性实验结果,如图所示,3株铜绿假单胞菌的抗药性分离株在1至5代时,其MIC值在30-40 mg/L之间略有起伏,之后逐渐下降,第10代时MIC值约降至15 mg/L,与Kathon对标准菌株(ATCC9027)的平均MIC值一致。Ps.01比其余两株抗药性分离株Ps.02、Ps.03的MIC值略高,但整体趋势相同。Kathon对标准菌株的MIC值在8-15 mg/L之间相对稳定。而在Kathon不断诱导下的标准菌株在传代过程中MIC值逐渐升高,在第8代时达到35 mg/L,与3株铜绿假单胞菌抗药性分离株的MIC值相近,之后其相对稳定。

3 结论与讨论

3.1 主要腐败微生物种属

污染样品中分离腐败微生物以细菌为主,主要为芽孢杆菌属,其次是假单胞菌属和肠杆菌属(表1)。工业样品如涂料、胶黏剂及日化用品等含有许多能够被微生物利用的营养物质,芽孢杆菌中芽孢

形成不受氧等条件的限制且对不良的环境抵抗力强,假单胞菌属的细菌对营养条件需求简单且能利用多种有机化合物,这可以解释芽孢杆菌属及假单胞菌属在受污染的产品中占绝对优势的原因。肠杆菌属是人与动物肠道内常见的寄生菌,也常见于环境土壤以及水体中,其存在数量通常是判断产品被污染的程度^[7],这3类细菌约占腐败微生物总数的70%,其中铜绿假单胞菌、阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、及克雷伯氏菌等都为人类的致病菌,因此环境卫生监控不严和人类活动频繁也是导致微生物污染的主要原因之一。霉菌的污染主要出现在工业原料以及循环用水和废水中,以木霉、青霉和曲霉为主,这与潮湿且低温的环境因素有关。此外实验中所用的分离技术都以好氧菌为基础并未分离到厌氧菌,这并不能说明厌氧菌不是造成工业腐败的污染因素,因此不能排除厌氧菌对工业污染的可能性。

3.2 主要抗药性微生物种属

杀菌剂对腐败微生物MIC的测定结果表明,虽然芽孢杆菌在污染微生物总数上占优势(31.37%),

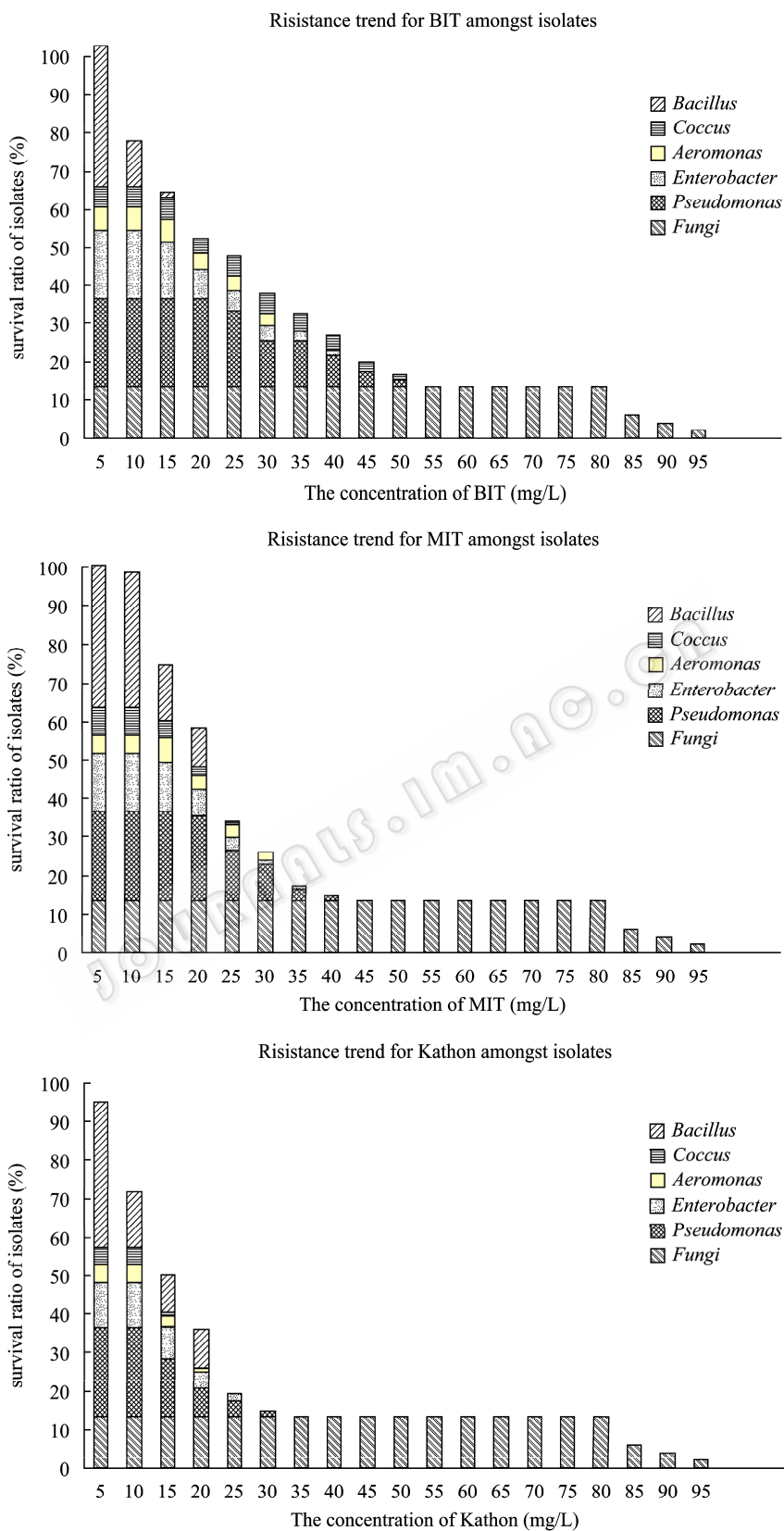


图 1 腐败微生物对 3 种杀菌剂的抗药性趋势分布

Fig. 1 Distribution of resistance trend for three biocide amongst main isolates

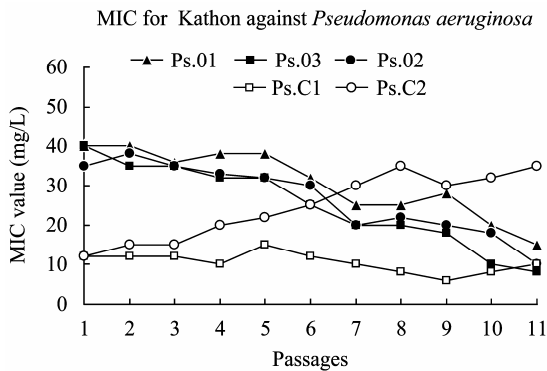


图2 Kathon对铜绿假单胞菌株MIC的传代稳定性
Fig. 2 The Passage stability of MIC for Kathon against *Pseudomonas aeruginosa*

注: Ps.01、Ps.02、Ps.03: 分离到的3株抗药性铜绿假单胞菌株; Ps.C1: 连续传代培养的铜绿假单胞菌对照标准菌株(ATCC9027); Ps.C2: Kathon连续诱导的铜绿假单胞菌对照标准菌株(ATCC9027).

Note: Ps.01, Ps.02, Ps.03: Three isolates of resistant *Pseudomonas aeruginosa*; Ps.C1: The contrast standard strain of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) with continuous passage culture; Ps.C2: The contrast standard strain of *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027) with Kathon continuous induced.

但是对杀菌剂具有较高抗药性的优势菌群却是铜绿假单胞菌属(33.78%)。这说明造成工业污染的腐败微生物与抗药性微生物是具有相关性但含义却并不相同的2个概念。显示较强抗药性的铜绿假单胞菌,与该菌本身具有外排系统以及外膜通透性障碍等天然抗药性机制的性质有关^[8]。在实验条件下大多数芽孢杆菌缺乏对杀菌剂的抗药性,而其余的抗药性水平也十分低下(图1)。我们不排除这种现象与该试验选择的抗性评价方法的相关性。微生物对工业杀菌剂抗药性试验目前多借用抗生素药敏实验的测试方法,抗生素对微生物的作用机理和使用环境与杀菌剂完全不同,造成工业污染的因素除了微生物本身的抗药性外,显然与其使用环境密切相关,用MIC值所做的判断只能反映出部分实际情况。

3.3 微生物对工业杀菌剂抗药性的原因

腐败微生物数据库中 G^- 占 46.91%, 而 G^+ 占 32.71% (表1), 抗药性水平试验中 G^- 的平均抗药性水平高于 G^+ (表4), 这说明 G^- 更容易对异噻唑啉酮类杀菌剂产生抗药性, 细菌细胞膜结构和成分的差异可能与抗药性机制密切相关。

工业上对微生物抗药性的认识借鉴于抗生素的抗药性。目前对杀菌剂抗药性的定义仍存在争议^[9], 通常认为微生物抗药性通常是微生物菌株性状可遗传的变异, 其形成不易受外界条件的影响, 而耐药

性是表型性状上的改变, 容易因环境的更替而变化甚至消失。本研究中铜绿假单胞菌抗药性分离菌株经过多次传代培养后, 抗性水平逐渐降低或消失(图2), 并不表现为遗传可稳定性。因此严格说来实验中获得的菌株应称为耐药性菌株。耐受性表型是由环境因素所引起的在感受性上短暂改变的现象。该结论通过 Kathon 对铜绿假单胞标准菌株的传代诱导实验(图2)得到了证明: 铜绿假单胞菌通过杀菌剂的诱导获得了生理耐受性。此外本研究中分离到的若干抗性铜绿假单胞菌株有较强的形成生物膜(Biofilm)的特性(数据未发表)。生物膜是细菌生长过程中为适应生存环境而在固体表面上生长的一种与游离态(Planktonic)细胞相对应的存在形式, 菌体附着到物体表面后分泌粘性胞外聚合物并在其中生长繁殖而形成的细菌群落, 即为生物膜。在自然界及某些工业生产环境如水循环系统中, 只要条件允许, 绝大多数细菌都可以形成生物膜。生物膜细胞与浮游细胞相比更具有抗药性, 该现象已在医疗行业被广泛关注^[10]。以上说明工业腐败微生物显示耐药性而不是真正的抗药性, 其原因除了与工业杀菌剂本身作用机制(靶位点的非特异性)以及使用方法(抑制浓度下长时间的持续)有关外^[11], 也可能与细菌生物膜的形成有关。

4 展望

本研究建立了华南地区工业污染微生物的数据库, 并对微生物抗药性原因进行了分析, 为异噻唑啉酮衍生物及其他类工业杀菌剂的抗性治理工作打下坚实的基础。今后的研究工作包括以下几方面: (1) 革兰氏阴性细菌细胞壁在抗药性产生的机理上的研究; (2) 利用分子生物学技术、电子显微镜技术等手段探讨细菌生物膜在细菌抗药性形成中的影响和作用; (3) 工业杀菌剂抗性风险评估体系的建立以及相应的治理措施的研究。

参考文献

- [1] 王春华, 谢小保, 曾海燕, 等. 微生物对工业杀菌剂的抗药性研究进展. 微生物学通报, 2007, 34(4): 791-794.
- [2] 陈艺彩, 谢小保, 施庆珊, 等. 异噻唑啉酮衍生物类工业杀菌剂的研究进展. 精细与化学专用品, 2010, 18(1): 43-46.

- [3] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995: 308-500.
- [4] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [5] 魏景超. 真菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1979.
- [6] 陈德富, 陈喜文. 现代分子生物学实验技术. 科学出版社, 2006.
- [7] 陈盼, 贺稚非, 龚霄, 等. 食品中大肠杆菌的快速检测方法. 食品工程, 2007, 1(1): 58-61.
- [8] 姚兴伟. 铜绿假单胞菌耐药性的研究. 吉林大学硕士学位论文, 2008.
- [9] Russell AD. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Infectious Diseases*, 2003(3): 794-803.
- [10] Chapman JS. Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003(51): 133-138.
- [11] 史巧, 王红宁, 刘立. 细菌生物膜与耐药性相关性研究进展. 微生物学通报, 2008, 35(10): 1633-1637.

2010 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表

| 序号 | 会议名称 | 主办单位 | 时间 | 人数 | 地点 | 联系人 |
|----|------------------------------------|-------------------------|-----------------|-----|--------|--|
| 1 | 第三届生物资源与环境调控学术研讨会 | 中国微生物学会农业微生物专业委员会 | 5-6 月 | 120 | 安徽合肥 | 李峰 010-82109561 |
| 2 | 曲霉和曲霉病研讨会 | 中国微生物学会真菌学专业委员会 | 5 月 15-16 日 | 150 | 天津 | 刘伟 010-83573056 |
| 3 | 第八届中日病毒学会议 | 中国微生物学会病毒学专业委员会 | 7 月 4-7 日 | 100 | 黑龙江哈尔滨 | 张凤民 0451-86669576 钟照华 0451-86685122 |
| 4 | 第八届全国微生物学青年学者学术研讨会 | 中国微生物学会基础微生物学专业委员会 | 7 月 21-24 日 | 150 | 云南昆明 | 李文均 0871-5033335 |
| 5 | 第三届全国农业微生物研究及产业化研讨会 | 中国微生物学会农业微生物专业委员会 | 8 月 | 120 | 新疆阿拉尔 | 张利莉 agmicrob@mail.hzau.edu.cn |
| 6 | 第二届微生物资源学术研讨会 | 中国微生物学会微生物资源专业委员会 | 8 月 | 150 | 黑龙江大庆 | 阮志勇 13301101231 |
| 7 | 第十一届全国土壤微生物学术讨论会暨第四届全国微生物肥料生产技术研讨会 | 中国微生物学会农业微生物专业委员会 | 9-10 月 | 150 | 湖南长沙 | 李俊 010-68975891 |
| 8 | 合成生物学学术研讨会 | 中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会 | 9-10 月 | 80 | 上海 | 朱春宝 021-62896804 |
| 9 | 2010 年全国微生物毒素与创伤感染学术会议 | 中国微生物学会微生物毒素专业委员会 | 9 月 17-20 日 | 250 | 重庆 | 梁华平 023-68757404 |
| 10 | 第 11 届中日韩国际酶工程学术研讨会 | 中国微生物学会酶工程专业委员会 | 10 月 | 150 | 四川成都 | 金城 64807425 |
| 11 | 病原进化与致病机制国际研讨会 | 中国微生物学会分析微生物学专业委员会 | 10 月 22-25 日 | 150 | 江苏镇江 | 倪斌 |
| 12 | 第十三次全国环境微生物学学术研讨会 | 中国微生物学会环境微生物学专业委员会 | 10 月 | 500 | 江苏南京 | 蒋建东 025-84395326 |
| 13 | 2010 年中国微生物学会学术年会 | 中国微生物学会 | 10 月 | 500 | 安徽 | 王旭 010-64807200 |
| 14 | 首届全国芽胞杆菌研究及产业化研讨会 | 中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会 | 10 月 | 140 | 湖北武汉 | 翁锦周 bacillus@mail.hzau.edu.cn |
| 15 | 第三届全国微生物基因组学学术研讨会 | 中国微生物学会基础、农业微生物学专业委员会 | 11 月 | 150 | 福建厦门 | 邵宗泽 micgeno@mail.hzau.edu.cn |
| 16 | 第一届中国临床微生物学大会 | 中国微生物学会临床微生物学专业委员会 | 11 月 | 500 | 贵州遵义 | 李宣霖 13976609892 |