

二氧化氯对不同抗菌药物抗菌作用的影响

杨泽琪¹ 党福库² 杨喜东³ 程海鹏^{2*}

1 吉林农业大学动物医学院 2 北京康牧生物科技有限公司 3 北京康牧兽医药械有限公司

DOI:10.12238/as.v8i9.3288

[摘要] 我国养殖水体质量不佳,亟需进行水体消毒。二氧化氯(ClO_2)是一种高效、广谱的氧化性消毒剂,因其强氧化性和低耐药诱导特性,广泛用于水体消毒,可作为潜在消毒协同剂。饮水中添加抗生素是畜禽生产中防治细菌性疾病的主要手段,但饮水中二氧化氯对抗菌药物的抗菌活性影响的报道匮乏,因此本研究旨在探讨不同浓度二氧化氯对9种抗菌药物联用的抗菌活性的影响。结果表明不同浓度 ClO_2 对大肠杆菌均无直接的抗菌活性,40mg/L的 ClO_2 可以降低7种药物对大肠杆菌的MIC,具有协同作用。40mg/L的 ClO_2 对金黄色葡萄球菌表现出直接的抗菌活性,10mg/L的 ClO_2 对6种药物对金黄色葡萄球菌的抗菌活性有拮抗作用,应避免同步使用,防止药效降低。本试验揭示了 ClO_2 对抗生素抗菌活性的影响,旨在为氧化消毒剂与抗生素的合理联用提供参考。

[关键词] 二氧化氯; 抗菌药物; 大肠杆菌; 金黄色葡萄球菌; 抗菌活性

中图分类号: R917 文献标识码: A

Effect of Chlorine Dioxide on the Antimicrobial Action of Different Antibacterial Drugs

Zeqi Yang¹ Fuku Dang² Xidong Yang³ Haipeng Cheng^{2*}

1 School of Animal Medicine, Jilin Agricultural University

2 Beijing Kang Mu Biotechnology Co., LTD

3 Beijing Kangmu veterinary medicine equipment Co., LTD

[Abstract] The poor quality of aquaculture waters in China has created an urgent need for water disinfection. Chlorine dioxide (ClO_2) is a highly efficient, broad-spectrum oxidizing disinfectant widely used for water disinfection due to its strong oxidizing and low resistance-inducing properties, and can be used as a potential disinfection synergist. The addition of antibiotics to drinking water is the main means of combating bacterial diseases in livestock production, but there is a lack of reports on the effect of ClO_2 in drinking water on the antimicrobial activity of antimicrobial drugs, therefore, the present study was aimed at investigating the effect of different concentrations of ClO_2 on the antimicrobial activity of nine antimicrobial drugs in combination. The results showed that different concentrations of ClO_2 had no direct antimicrobial activity against *E. coli*, and 40 mg/L of ClO_2 could reduce the MIC of 7 drugs against *E. coli* with synergistic effect. 40 mg/L of ClO_2 showed direct antimicrobial activity against *S. aureus*, and 10 mg/L of ClO_2 had antagonistic effect on the antimicrobial activity of 6 drugs against *S. aureus*, which should be avoided to be used synchronously to prevent the decrease of drug efficacy. This experiment revealed the effect of ClO_2 on the antibacterial activity of antibiotics, aiming to provide a reference for the rational combination of oxidizing disinfectants and antibiotics.

[Key words] Chlorine dioxide; Antibacterial drugs; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; Antibacterial activity

水是生命之源,是动物生长不可缺少的要素。然而,我国地下水质量不佳,这对动物生长繁殖埋下巨大健康隐患。为保证畜禽健康,养殖用水常用二氧化氯等饮水消毒剂进行水质消杀,降低疾病风险。二氧化氯(ClO_2)因其非特异性氧化杀菌机制和低耐药诱导特性,被视为潜在的抗生素协同剂^[1]。 ClO_2 是一种强氧

化剂,能杀灭细菌,真菌和病毒,凭借其独特的理化性质和广谱杀菌能力,广泛用于细菌(如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等)、病毒(包括包膜和非包膜病毒)、真菌及生物膜的消杀。研究表明, ClO_2 对细菌杀灭效率显著优于次氯酸钠等传统消毒剂,其作用机制不依赖微生物代谢途径,而是通过直接氧化破坏细胞壁、

膜脂、蛋白质及核酸等关键生物分子,形成多靶点杀菌模式^[2-4]。这种物理化学消杀特性使其在医疗感染控制、食品加工灭菌及环境水体净化等领域得到广泛应用,并被世界卫生组织(WHO)列入饮用水安全消毒剂名录。

在集约化养殖中,大肠杆菌和金黄色葡萄球菌感染引发的细菌性疾病严重威胁畜禽健康,给畜牧业带来巨大的损失。为应对此危机,养殖企业普遍采用在饮水中添加抗生素的方式预防和治疗细菌性疾病感染。ClO₂作为第四代绿色消毒剂已广泛应用于饮用水净化、医疗器械灭菌等领域,但现有研究多聚焦于ClO₂的独立杀菌性能,与畜禽常用抗菌药物联用数据匮乏,对药物抗菌活性影响的系统性评估缺失,所以本试验构建了ClO₂-抗生素联用杀菌模型,通过微量肉汤稀释法,测定不同浓度梯度ClO₂(0、1、10、40mg/L)作用下,9种临床抗菌药物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的MIC值变化,分析二氧化氯与抗菌药物的联用效果。为氧化消毒剂与抗菌药物联合应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 药物及培养基

盐酸多西环素可溶性粉、氟必康氟苯尼考粉、梅里米先硫氰酸红霉素、盐酸林可/大观霉素可溶性粉、科泰宝酒石酸泰万菌素预混剂、科润泰妙净延胡索酸太妙菌素预混剂、酒石酸泰乐菌素、安特威恩诺沙星溶液、替米考星溶液、二氧化氯泡腾片均由北京康牧生物科技有限公司提供。氯化钠(购自国药集团化学试剂有限公司)、酵母粉(购自赛默飞世尔科技公司)、胰蛋白胨(购自北京奥博星生物技术有限责任公司)、MH培养基(购自青岛日水生物科技有限公司)。

1.1.2 试验菌株

试验菌株大肠杆菌ATCC25922、金黄色葡萄球菌ATCC29213由本实验室保存。

1.1.3 主要仪器

试验主要仪器见表1。

表1 试验主要仪器

仪器名称	生产厂家
酶标仪	赛默飞世尔(上海)仪器有限公司
SPX型智能生化培养箱	宁波江南仪器厂
组合式全温振荡培养箱	天津市莱普特瑞仪器设备有限公司
十万分之一电子天平	梅特勒-托利多(上海)有限公司
百分之一天平	上海佑科仪器仪表有限公司
紫外分光光度计	赛默飞世尔(上海)仪器有限公司

1.1.4 溶液配制

二氧化氯溶液配制:取一粒二氧化氯泡腾片溶解至1L无菌蒸馏水中,根据泡腾片中二氧化氯有效含量将二氧化氯溶液用无菌蒸馏水稀释至800、200、20mg/L备用。

LB液体培养基:精确称量0.5g酵母粉、1g胰蛋白胨粉、1g氯化钠加入100ml蒸馏水中搅拌均匀,分装到玻璃试管中,121℃

灭菌20min备用。

MH液体培养基:精确称量21gMH培养基倒入2000mL锥形瓶中,加入1000ml蒸馏水,搅拌均匀,121℃灭菌20min备用。

1.2 试验方法

1.2.1 菌悬液准备

分别挑取LB平板上大肠杆菌和金黄色葡萄球菌单菌落接种于2只5mLB液体培养基试管中,37℃、170rpm振荡培养至对数生长期(约4-6h),用紫外分光光度计调整菌液浓度至OD600=0.5,4℃保存备用。

1.2.2 MIC试验

在96孔板中采用二倍稀释法将药物倍比稀释至所需浓度。首孔加160 μL MH液体培养基,第2-12孔各加90 μL培养基。第1孔加入20 μL药液混匀后,吸取90 μL至第2孔,直至稀释到第10孔后弃掉90 μL。分别在各孔中加入10 μL浓度为800、200、20mg/L的二氧化氯溶液,0mg/L二氧化氯组添加10 μL无菌蒸馏水代替。最后每孔加入100 μL菌悬液(终体积200 μL,二氧化氯终浓度梯度:40/20/10/0mg/L),分别设置阳性对照(菌液+无菌培养基)与阴性对照(无菌培养基),37℃静置培养16-18h后,记录各组MIC结果。

2 结果

2.1 不同浓度二氧化氯与抗菌药物联用对大肠杆菌抗菌活性的影响

本试验研究了3组不同浓度的ClO₂与9种抗生素联用对大肠杆菌的抗菌活性影响(结果见表2)。试验结果表明,不同浓度ClO₂对大肠杆菌均无直接的抗菌活性。40mg/L的ClO₂与多西环素、氟苯尼考联用,可使抗菌活性分别提高2倍和4倍;而与红霉素联用,10mg/L和40mg/LClO₂可使其抗菌活性提高2倍。40mg/LClO₂分别与泰妙菌素和泰乐菌素联用,可使抗菌活性提高4倍和2倍,与恩诺沙星和替米考星联用,可使其抗菌活性提高2倍。而不同浓度ClO₂与林可/大观霉素、泰万菌素联用,均无增效活性。

表2 不同浓度二氧化氯与抗菌药物联用对大肠杆菌的MIC。(单位: mg/mL)

ClO ₂ 浓度	C1	MIC									
		多西环素	氟苯尼考	红霉素	林可/大观霉素	泰妙菌素	泰万菌素	泰乐菌素	恩诺沙星	替米考星	
40	-	0.016	0.16	5.12	5.12	0.32	0.025	1.28	0.03125	2.5	
10	-	0.032	0.32	5.12	10.24	1.28	0.025	2.56	0.06250	2.5	
1	-	0.032	0.64	>10.24	5.12	1.28	0.025	2.56	0.06250	2.5	
0	-	0.032	0.64	>10.24	2.56	1.28	0.025	2.56	0.06250	1.25	

注:“-”表示二氧化氯对细菌无直接杀菌作用,“+”表示二氧化氯对细菌有直接杀菌作用。(下同)

2.2 不同浓度二氧化氯与抗菌药物联用对金黄色葡萄球菌抗菌活性的影响

在金黄色葡萄球菌抗菌试验组中,40mg/L浓度ClO₂对金黄色葡萄球菌表现出直接的抗菌活性(结果见表3)。在联合用药组中,10mg/LClO₂与红霉素联用,可使抗菌活性降低8倍。10mg/LClO₂

与林可/大观霉素、泰万菌素、泰妙菌素联用时, 抗菌活性呈现4倍降低; 与泰乐菌素、氟苯尼考的联合可将其抗菌活性降低2倍, 而不同浓度的二氧化氯与多西环素、恩诺沙星、替米考星联用中未表现出拮抗作用。

表3 不同浓度二氧化氯与抗菌药物联用对金黄色葡萄球菌的

MIC。(单位: mg/mL)

ClO ₂ 浓度	C1	MIC								
		多西环素	氟苯尼考	红霉素	林可/大观霉素	泰妙菌素	泰万菌素	泰乐菌素	恩诺沙星	替米考星
40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	-	<0.001	0.08	0.128	0.005	2.56	0.032	0.0016	0.0125	5
1	-	<0.001	0.04	0.032	0.01	1.28	0.016	0.0032	0.0125	5
0	-	<0.001	0.04	0.016	0.00125	0.64	0.008	0.0008	0.0125	5

3 分析与讨论

本试验主要目的是评价氧化消毒剂二氧化氯(ClO₂)对抗菌药物的抗菌作用的影响, 结果显示, 高浓度二氧化氯对金黄色葡萄球菌(革兰氏阳性菌)具有直接杀菌作用, 可能与ClO₂诱导的细胞膜损伤密切相关。研究表明^[5]在ClO₂处理金黄色葡萄球菌后细胞膜出现皱缩, 细胞壁与细胞膜脱离, 细胞质出现凝集, 导致细胞膜通透性增加, 进而导致细菌死亡。而对大肠杆菌(革兰氏阴性菌)无直接杀菌作用。可能是大肠杆菌具有外膜脂多糖层通过限制ClO₂渗透或激活过氧化氢酶等抗氧化系统, 削弱其直接杀菌效果^[6,7]。此外, 金黄色葡萄球菌对氧化的敏感性可能高于大肠杆菌, 导致其在ClO₂作用下的快速失活。

在大肠杆菌抑菌实验中, ClO₂虽无直接杀菌作用, 但显著增强了氟苯尼考、多西环素和恩诺沙星的抗菌能力。ClO₂可能通过氧化细菌外膜脂质或破坏膜蛋白结构, 增加膜透性, 促进药物的细胞内积累^[8,9]。40mg/mL的ClO₂和泰妙菌素联用可以显著提高杀菌活性, 可能是高浓度ClO₂增加细胞膜的通透性, 泰妙菌素在胞内积累量增加使细菌核糖体蛋白合成受阻, 抑制细菌能量代谢, 导致细菌死亡。泰万菌素的MIC结果在不同ClO₂浓度下均保持稳定, 表明其作用机制可能独立于细菌膜结构。

在金黄色葡萄球菌抑菌实验中, 高浓度ClO₂的直接杀菌作用可能掩盖了部分药物的真实活性, 但联用后红霉素、林可/大观霉素、泰万菌素、泰妙菌素和氟苯尼考MIC升高, 提示存在拮抗效应。ClO₂消耗细菌内还原性物质, 可能干扰氟苯尼考等还原激活的前药代谢过程。此外, 本试验还出现ClO₂对个别药物(如红霉素)抑菌效果的影响在两种菌株中呈现两种相关的作用结果, 这一现象可能和药物本身的杀菌特性有关, 革兰氏阴性菌外膜的脂多糖层及小孔径孔蛋白(OmpF直径仅1.2nm)形成渗透屏障, 红霉素的穿膜速率比革兰氏阳性菌低10~100倍^[10]。对于多西环素、恩诺沙星等抗菌活性与ClO₂无影响的药物, 可与ClO₂消毒同时给药, 或在ClO₂消毒后短时间内给药, 以增强疗效。林

可/大观霉素、红霉素等易被ClO₂抑制的药物, 应避免与高浓度ClO₂联用, 或调整给药顺序, 如先用药后消毒。

评价ClO₂是否会抑制药物的抗菌作用, 比如是否破坏药物本身的活性结构, 需要读取低浓度ClO₂处理组中药物的抗菌情况。本研究的局限性主要在于未通过HPLC或质谱验证ClO₂与抗生素的直接化学相互作用, 仅依赖MIC值变化可能无法区分药物失活与协同效应; MIC评估未能结合时间-杀菌曲线或活菌计数动态分析杀菌动力学, 且缺乏扫描电镜对细菌膜损伤的形态学观察。但本研究通过ClO₂与9种抗菌药联用首次系统性揭示了ClO₂对抗生素抗菌活性的影响, 并基于菌种与药物特异性提出个性化联用策略, 为氧化消毒剂与抗生素的合理联用提供了新的指导方法。

参考文献

- [1]李哲,崔永亮,段玉奇,等.复方ClO₂消毒剂的增效应用与发展[J].应用化工,2021,50(7):1985~1987,1992.
- [2]Cho M, Kim J, Kim J Y, et al. Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants[J]. Water Res, 2010, 44(11):3410~3418.
- [3]王颖,李娜,鲁翌,等.ClO₂、次氯酸钠及其联合消毒模拟水样效果的比较[J].卫生研究,2008,37(3):285~289.
- [4]朱石荻,刘义明,王玉凤,等.ClO₂对微生物的杀灭机制研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2023(14):33~36.
- [5]刘静,徐飞,张靖菊,等.ClO₂奶牛乳头消毒剂杀菌效果评价及杀菌机理研究[J].中国畜牧兽医,2021,48(07):2635~2643.
- [6]Imlay J A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium[J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(7):443~454.
- [7]Silhavy T J, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(5):a000414.
- [8]徐闯,巫寅虎,胡洪营,等.ClO₂对不同微生物的灭活特性及其对群落结构特征的影响[J].环境工程,2021,39(10):57~63.
- [9]Ofori I, Maddila S, Lin J, et al. Chlorine dioxide oxidation of *Escherichia coli* in water - A study of the disinfection kinetics and mechanism[J]. J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 2017, 52(7):598~606.
- [10]Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67(4):593~656.

作者简介:

杨泽琪1(2004--)女,汉族,吉林省临江市人,吉林农业大学本科在读,主要从事动物疾病诊断工作。