

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2017.01.009

· 论 著 ·

## 酸性氧化电位水对铜绿假单胞菌的杀菌机制研究

赵凯丽<sup>1</sup>, 李武平<sup>1</sup>, 张晓娜<sup>1</sup>, 王刚<sup>2</sup>, 庄玉晨<sup>2</sup>

(1. 第四军医大学西京医院, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学西京皮肤医院, 陕西 西安 710032)

**[摘要]** 目的 探讨酸性氧化电位水(EOW)对铜绿假单胞菌的杀菌机制。方法 以铜绿假单胞菌作为研究对象,从蛋白质渗漏,核酸和细胞膜钙离子通透性等方面对 EOW 的杀菌机制进行研究,同时以 2%戊二醛作为阳性对照组,以生理盐水(NS)作为阴性对照组。结果 以 EOW、2%戊二醛对铜绿假单胞菌作用 30 s 杀灭率 > 99.99%,作用 60 s 杀灭率可达 100.00%。EOW、NS、2%戊二醛作用铜绿假单胞菌 60 s 后,经 BCA 法检测蛋白渗漏,分别为(96.00 ± 7.42)、(94.15 ± 7.49)、(216.97 ± 10.35) μg/mL,总体比较,差异有统计学意义( $F = 613.20, P < 0.01$ ),2%戊二醛组高于 EOW 组、NS 组;蛋白渗漏量不随作用时间增加而改变(均  $P > 0.05$ )。随机多态性扩增 DNA 电泳图谱显示,EOW 组与 NS 组均在 500~1 000 kb 间显示亮度较高的密集条带,2%戊二醛组无扩增条带。EOW 及 2%戊二醛作用后钙离子荧光强度均低于 NS 组。结论 EOW 可能的杀菌机制是使铜绿假单胞菌细胞膜通透性受到一定程度的损伤,致使  $Ca^{2+}$  泄漏,但未能造成蛋白质泄漏,对其核酸损伤作用不明显,DNA 可能并非 EOW 杀菌靶点。

**[关键词]** 酸性氧化电位水;戊二醛;铜绿假单胞菌;杀菌机制;蛋白质泄漏;核酸;细胞膜通透性

**[中图分类号]** R187 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)01-0041-05

## Bactericidal mechanism of electrolyzed oxidizing water against *Pseudomonas aeruginosa*

ZHAO Kai-li<sup>1</sup>, LI Wu-ping<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-na<sup>1</sup>, WANG Gang<sup>2</sup>, ZHUANG Yu-chen<sup>2</sup> (1 Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2 Xijing Skin Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the bactericidal mechanism of electrolyzed oxidizing water (EOW) against *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). **Methods** Bactericidal mechanism of EOW against *P. aeruginosa* was studied through intracellular protein leakage, nucleic acid, and cell membrane calcium ion permeability, 2% glutaraldehyde was used as positive control group, and normal saline (NS) was used as negative control group. **Results** The killing rates of EOW and 2% glutaraldehyde to *P. aeruginosa* were both > 99.99% with 30-second contact time, and 100.00% with 60-second contact time. After 60-second contact with EOW, NS, and 2% glutaraldehyde, the protein leakage of *P. aeruginosa* detected by bicinchoninic acid (BCA) were (96.00 ± 7.42), (94.15 ± 7.49), and (216.97 ± 10.35) μg/mL, respectively, difference was significant ( $F = 613.20, P < 0.01$ ), 2% glutaraldehyde group was higher than EOW group and NS group; protein leakage did not change with the increase of contact time (all  $P > 0.05$ ). Electrophoretogram of random amplified polymorphic DNA showed high intensity dense band between 500 - 1000 Kb in EOW group and NS group, while 2% glutaraldehyde group was without amplified bands. The fluorescence intensity of calcium ion of EOW group and 2% glutaraldehyde group were both lower than that of NS group. **Conclusion** Bactericidal mechanism of EOW may be due to the damage of membrane permeability of *P. aeruginosa*, which causes  $Ca^{2+}$  leakage, but fails to cause protein leakage, the damage to nucleic acid is not obvious, DNA may not be a bactericidal target of EOW.

**[收稿日期]** 2016-06-01

**[作者简介]** 赵凯丽(1991-),女(回族),甘肃省天水市人,硕士研究生,主要从事重症监护与医院感染研究。

**[通信作者]** 李武平 E-mail:liwuping@fmmu.edu.cn

[Key words] electrolyzed oxidizing water; glutaraldehyde; *Pseudomonas aeruginosa*; bactericidal mechanism; protein leakage; nucleic acid; cell membrane permeability

[Chin J Infect Control, 2017, 16(1): 41 - 45]

酸性氧化电位水(electrolyzed oxidizing water, EOW)自 1987 年由日本研发问世后,其以安全、高效、环保等优点,在抗感染方面,包括国内外医疗、食品等领域均发挥了显著效果。以往对于 EOW 杀菌机制的研究主要侧重于某一理化性质,认为 EOW 中起主导作用的杀菌因素包括低酸性,高氧化还原电位 ORP,活性氧以及有效氯<sup>[1]</sup>,其中有效氯起主导作用。EOW 使细菌胞壁皱缩降解,进而胞质内蛋白质变性酶失活<sup>[2]</sup>;抑制了细胞呼吸作用,降低了细胞膜上的 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP 酶活性,导致细胞内大分子物质泄漏<sup>[3]</sup>。关于 EOW 杀菌机制尚无统一论,存在争议,还需进一步深入研究。本实验以铜绿假单胞菌作为研究对象,从蛋白质渗漏,核酸和细胞膜钙离子通透性等方面对 EOW 的杀菌机制进行研究,同时以 2%戊二醛作为阳性对照组,以生理盐水(normal saline, NS)作为阴性对照组进行研究。

## 1 材料与方 法

1.1 实验材料与仪器 铜绿假单胞菌 ATCC 15442 由第四军医大学附属西京医院检验科提供。EOW 由酸性氧化电位水生成器日本圣太科(规格型号 SONTECH-1000)生成,2%戊二醛购于山东利尔康有限公司, SX-610 型笔式 pH 计和 ORP 检测笔,有效氯检测仪 SJ/S-CL501C,天根细菌 DNA 提取试剂盒,天根 BCA 蛋白质定量试剂盒,随机引物序列设计参照文献<sup>[4]</sup>,为 5'-AGCGGGCCAA-3',由上海生工生物工程有限公司合成引物,普通 PCR 仪 MyCycler, cwbio2×Taq MasterMix 购于北京康为世纪,碧云天生物技术 Fluo-3 AM(钙离子荧光探针),酶标仪 Model680,紫外分光光度计 DU-530。图像处理采用 image J 软件。

1.2 中和剂鉴定试验 试验菌铜绿假单胞菌为 ATCC 15442, EOW 中和剂为 1%硫代硫酸钠, 2%戊二醛中和剂为甘氨酸+吐温 100+卵磷脂,中和剂均用 PBS 配制后经高压蒸汽灭菌,进行中和剂鉴定。根据 2002 版《消毒技术规范》试验平行设置 6 组。

1.3 杀菌效果测定 取 24 h 细菌新鲜培养液,配制试验用菌悬液,取 1 mL 菌悬液加入至 9 mL 消毒剂中,混匀,分别作用 60、120 s 后,立即取 1 mL 混

合液加入到 9 mL 中和剂中作用 10 min,对照组用 NS 进行同样操作。吸取 0.2 mL 采用平板倾注计数法进行菌落总数测定, TSA 培养基 37 ℃ 培养 24 h 后,进行菌落计数,试验重复 3 次。

### 1.4 蛋白渗漏量测定

1.4.1 样本制备 配制实验用菌悬液,取 4 支无菌试管中分别加入 0.5 mL 菌悬液,试验组分别加入 4.5 mL EOW(pH = 2.7)、2%戊二醛及 NS,作用至预定时间后,分别经  $\varphi = 0.22 \mu\text{m}$  微孔滤过膜滤过,取滤液备用。

1.4.2 二喹啉甲酸法(BCA 法)标准蛋白配制及测定 参照天根 BCA 蛋白定量试剂盒说明书:(1)用 NS 稀释标准品;(2)根据样本数量按 50 : 1 配制 BCA 工作液,充分混匀;(3)吸取 25  $\mu\text{L}$  BSA 标准液和待测细菌滤液加入到 96 孔板;(4)每孔加入 220  $\mu\text{L}$  BCA 工作液,混匀,加盖 37 ℃ 孵育 30 min 后冷却至室温,酶标仪检测 562 nm 处吸光度。(5)以 OD 值为横坐标,标准蛋白浓度为纵坐标绘制标准曲线,根据标准曲线计算 3 组蛋白渗漏量。

### 1.5 对铜绿假单胞菌 DNA 的作用

1.5.1 对铜绿假单胞菌提纯 DNA 的作用 DNA 样本制备:取 24 h 新鲜细菌培养液,参照天根细菌 DNA 基因组提取试剂盒说明书进行 DNA 提取。取 1  $\mu\text{L}$  提纯 DNA,分别加入至 9  $\mu\text{L}$  EOW、2%戊二醛、NS 中作用 60 s,迅速加入至 90  $\mu\text{L}$  中和剂混匀,作用 10 min 备用。

1.5.2 铜绿假单胞菌随机多态性扩增 随机引物 5'-AGCGGGCCAA-3', 10  $\mu\text{L}$  反应体系:引物 2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 1  $\mu\text{L}$ , Taq Master-Mix 6  $\mu\text{L}$ ;扩增条件:94 ℃ 2.5 min,变性 94 ℃ 45 s,退火 41 ℃ 1 min,延伸 72 ℃ 1.5 min,共 30 个循环,72 ℃ 5 min,扩增完成后进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 对铜绿假单胞菌细胞膜通透性的作用 制备菌悬液,取 100  $\mu\text{L}$  分别加入至 900  $\mu\text{L}$  EOW、2%戊二醛及 NS 中混匀,作用 60 s 后取混合液 100  $\mu\text{L}$  分别加入到 900  $\mu\text{L}$  中和剂中作用 10 min,每管避光加 1  $\mu\text{L}$  荧光探针 Fluo-3AM,使其终浓度 5  $\mu\text{mol/L}$ ,震荡混匀后置于 37 ℃ 恒温箱孵育 45 min 进行探针装载,装载完成后将各管离心 8 000 r/min, 3 min,弃上清后加入 1 000  $\mu\text{L}$  无菌

PBS 缓冲液漂洗 2 次,进行激光共聚焦观察。

1.7 统计处理 应用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析,多组间比较用方差分析法进行差异分析,数据采用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较采用 SNK 检验法,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 中和剂鉴定结果 中和剂鉴定结果显示,第 1 组无菌生长,第 2 组菌落生长较第 1 组多,第 3、4、5 组菌落生长数比较,差异无统计学意义,第 6 组无菌生长。EOW 组间菌落数误差率为 9.112%,2%戊二醛组间菌落误差率为 9.086%,中和剂鉴定合格。见表 1。

2.2 杀菌试验结果 以 EOW(pH = 2.7,有效氯含量 40 mg/L)及 2%戊二醛对铜绿假单胞菌标准菌株 ATCC 15442 作用 30 s 杀灭率 >99.99%,作用 60 s 杀灭率可达 100.00%,两种消毒剂对铜绿假单胞菌杀菌效果比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。NS 对照组平均菌落数为  $20.20 \times 10^6$  CFU/mL。

表 1 不同组别中和剂鉴定结果(平均回收菌落数,  $\times 10^6$  CFU/mL)

Table 1 Identification results of neutralizer in different groups (Average number of recovered bacteria,  $\times 10^6$  CFU/mL)

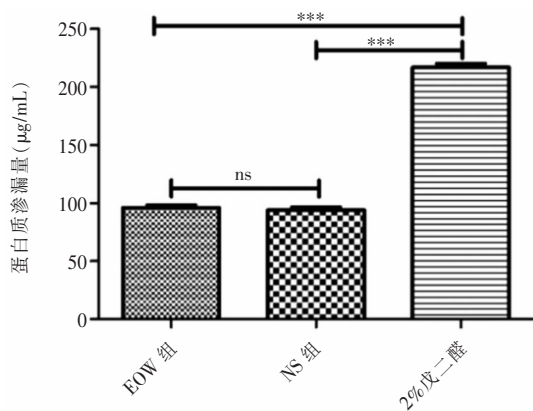
实验分组	EOW 组	2%戊二醛组
第 1 组:消毒剂 + 菌悬液	0	0
第 2 组:(消毒剂 + 菌悬液) + 中和剂	7.9	9.2
第 3 组:中和剂 + 菌悬液	21.9	20.1
第 4 组:(消毒剂 + 中和剂) + 菌悬液	18.6	21.7
第 5 组:稀释液 + 菌悬液	17.3	16.9
第 6 组:稀释液 + 中和剂 + 培养基	0	0

2.3 蛋白质渗漏测定结果 EOW、NS、2%戊二醛作用铜绿假单胞菌 60 s 后,经 BCA 法检测蛋白渗漏,分别为  $(96.00 \pm 7.42)$ 、 $(94.15 \pm 7.49)$ 、 $(216.97 \pm 10.35) \mu\text{g/mL}$ ,总体比较,差异有统计学意义 ( $F = 613.20, P < 0.01$ ),2%戊二醛组高于 EOW 组、NS 组。蛋白渗漏量不随作用时间增加而改变(均  $P > 0.05$ )。见表 2、图 1~2。

表 2 铜绿假单胞菌 EOW、2%戊二醛及 NS 作用不同时间后蛋白渗漏情况 ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$ )

Table 2 Protein leakage of *P. aeruginosa* after different contact time with EOW, 2% glutaraldehyde, and NS ( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mL}$ )

组别	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min	F	P
EOW 组	$93.08 \pm 2.12$	$91.82 \pm 1.59$	$91.67 \pm 2.67$	$91.74 \pm 1.67$	$93.80 \pm 0.43$	0.187	0.833
NS 组	$90.88 \pm 2.34$	$91.03 \pm 0.23$	$89.99 \pm 1.10$	$91.91 \pm 2.24$	$89.04 \pm 2.21$	2.603	0.115
2%戊二醛组	$202.02 \pm 1.88$	$198.79 \pm 2.06$	$197.80 \pm 2.36$	$201.76 \pm 2.67$	$202.51 \pm 2.37$	0.063	0.940



\*\*\*:表示差异有统计学意义;ns:表示差异无统计学意义

图 1 铜绿假单胞菌 EOW、2%戊二醛及 NS 作用 60 s 后蛋白渗漏情况 ( $\mu\text{g/mL}$ )

Figure 1 Protein leakage of *P. aeruginosa* after 60-second contact with EOW, 2% glutaraldehyde, and NS ( $\mu\text{g/mL}$ )

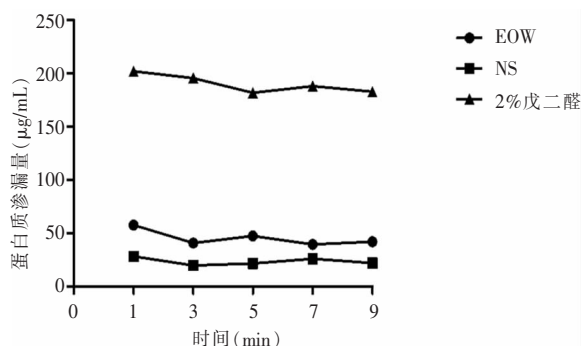
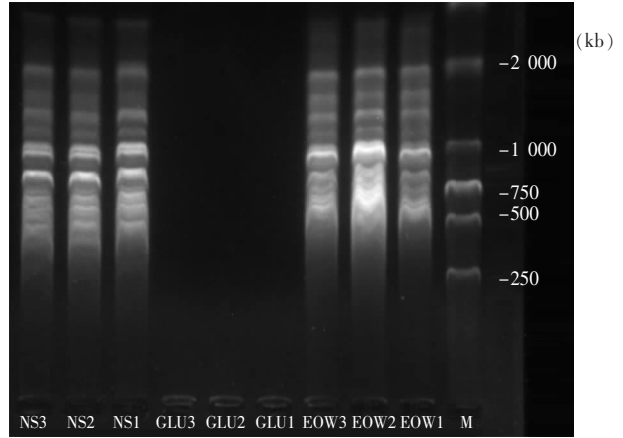


图 2 铜绿假单胞菌 EOW、2%戊二醛及 NS 作用不同时间后蛋白渗漏情况

Figure 2 Protein leakage of *P. aeruginosa* after different contact time with EOW, 2% glutaraldehyde, and NS ( $\mu\text{g/mL}$ )

2.4 对铜绿假单胞菌 DNA 的作用结果 EOW 作用于铜绿假单胞菌 DNA 60 s 后,经扩增后于电泳检测两组 DNA 指纹图谱,均在 500~1 000 kb 间显示亮度较高的密集条带。2%戊二醛作用后的铜绿假单胞菌 DNA 经 PCR 扩增电泳检测无 DNA 条带显示。见图 3。

2.5 对铜绿假单胞菌作用后细胞膜钙离子通透性测定结果 激光共聚焦结果显示,EOW、2%戊二醛、NS 处理后铜绿假单胞菌钙离子荧光强度分别为  $40.50 \pm 4.42$ 、 $47.63 \pm 3.77$ 、 $1\,903.75 \pm 16.12$ ,总体比较,差异有统计学意义 ( $F = 82\,580, P < 0.01$ ),EOW 组、2%戊二醛组均低于 NS 组,仅散在分布于各视野。见图 4。



EOW:为酸性氧化电位水;GLU:为 2%戊二醛;NS:为生理盐水;编号 1,2,3 为三组样本;M 为分子量为 2 000kb 的 DNAMarker

图 3 EOW、2%戊二醛及 NS 对铜绿假单胞菌 DNA 作用后 PCR 扩增电泳图谱

Figure 3 Electrophoresis map of PCR amplified *P. aeruginosa* DNA after contact with EOW, 2% glutaraldehyde, and NS



a: EOW; b: 2%戊二醛; c: NS

图 4 EOW、2%戊二醛及 NS 处理后对铜绿假单胞菌钙离子荧光强度的影响

Figure 4 Effect of EOW, 2% glutaraldehyde, and NS on  $Ca^{2+}$  fluorescence intensity of *P. aeruginosa*

### 3 讨论

3.1 EOW 对铜绿假单胞菌胞内蛋白质渗漏的作用情况 EOW 独特的理化性质 (pH < 3, 高 ORP > 1 100 mv, 低浓度有效氯 30~60 mg/L) 使其杀菌能力非单一因素所决定,文献<sup>[5]</sup>已报道中性 EOW 灭菌效果未发生改变,而有效氯浓度改变很大程度影响了其灭菌效果。氯可氧化细菌-SH 基,次氯酸盐可与胞质成分作用形成氮氯复合物干扰细胞代谢,而胞内物质的渗漏与细菌致死并无确切联系<sup>[6]</sup>。铜绿假单胞菌属革兰阴性细菌,其细胞壁的外膜及细胞膜上均镶嵌有蛋白质大分子,并且胞膜内包裹的细胞质由水、蛋白质、脂类、核酸及少量糖和无机盐

组成,若 EOW 使其细胞外膜破裂,则细菌滤液中会有蛋白质渗漏<sup>[1]</sup>,通过 BCA 法检测的蛋白质渗漏量应高于对照组,结果显示,EOW 作用 60 s 后与 NS 组相比蛋白渗漏差异无统计学意义,而 2%戊二醛组蛋白渗漏高于 EOW 及 NS 组,为排除作用时间对结果的影响,于不同作用时间后经 BCA 测定,结果显示,3 组蛋白质渗漏量未呈现出随时间改变趋势,推测 EOW 的杀菌机制可能不是使细菌细胞壁细胞膜破裂蛋白大分子渗漏。

3.2 EOW 对铜绿假单胞菌核酸的作用情况 随机扩增多态性 DNA,无需专门设计特定引物,由于随机引物在较低的复性温下能与基因组 DNA 非特异性的结合,当相邻两个引物间 DNA 小于 2 000 bp 时,就能得到扩增产物,可检测由于碱基发生缺失、

插入、突变、重排等所引发的 DNA 多态性<sup>[7]</sup>。戊二醛的杀菌机制是对细菌蛋白质和核酸的烷化作用,烷化后 G(鸟嘌呤)发生改变导致和 T 错配;G 结构破坏;DNA 不能复制,且 DNA 断裂,因此经 2% 戊二醛作用后的铜绿假单胞菌 DNA 无法进行 PCR,而 EOW 作用后 DNA 指纹图谱与对照组无差异,推测 EOW 未使铜绿的 DNA 发生断裂损伤。此结论与以往文献<sup>[8]</sup>报道,EOW 作用后细菌 DNA 的限制性片段多态性并未改变相符。DNA 损伤是一个极其复杂的过程,损伤类型包括点突变、缺失、插入、倒位或转位、双链断裂等,更进一步判断 DNA 损伤类型需进行 DNA 序列检测。

**3.3 EOW 对铜绿假单胞菌细胞膜通透性的作用情况** 细菌的生命状态与其细胞膜通透性密切相关,反映膜通透性改变的指标包括细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、核酸、蛋白质等。已证实 EOW 将造成细菌超微结构改变,细胞壁皱缩、酶失活、胞质内 DNA 及  $\text{K}^{+}$  渗漏<sup>[9]</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  作为重要的第二信使,调节着细胞功能,其浓度变化可预示细菌的存亡。Fluo-3 AM 是一种新型高度特异性  $\text{Ca}^{2+}$  荧光指示剂,只有进入细胞后经非特异性酯酶脱去 AM 酯成为脂溶性 Fluo-3 后留在细胞内与游离  $\text{Ca}^{2+}$  结合在激发光激发后被检测到,其荧光强度与  $\text{Ca}^{2+}$  浓度成正比。激光共聚焦结果显示,EOW 和 2% 戊二醛使得铜绿假单胞菌胞内  $\text{Ca}^{2+}$  含量低于 NS,推测 EOW 作用后铜绿假单胞菌细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$  通道发生改变,引起  $\text{Ca}^{2+}$  外漏,最终导致或促进细菌死亡。

综上所述,细菌细胞壁及核酸并非 EOW 的主要作用靶点,细胞膜通透性改变导致重要离子外漏是导

致细菌死亡的原因之一。此外,可能的杀菌机制包括干扰细菌代谢,使酶失活等还有待进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Zeng X, Ye G, Tang W, et al. Fungicidal efficiency of electrolyzed oxidizing water on *Candida albicans* and its biochemical mechanism[J]. J Biosci Bioeng, 2011, 112(1): 86-91.
- [2] 唐文伟,欧阳婷,曾新平,等. 酸性氧化电位水的杀菌机理研究进展[J]. 中国消毒学杂志, 2009, 26(1): 71-73.
- [3] 宣晓婷,刘东红,丁甜. 弱酸性电位水对单增李斯特菌致死机制的研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1): 245-251.
- [4] 彭奕冰,项明洁,张健,等. 随机扩增多态性 DNA 分型法在铜绿假单胞菌流行病学研究方面的应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(6): 605-607.
- [5] Xiong K, Liu HJ, Liu R, et al. Differences in fungicidal efficiency against *Aspergillus flavus* for neutralized and acidic electrolyzed oxidizing waters[J]. Int J Food Microbiol, 2010, 137(1): 67-75.
- [6] 张晓煜,吴清平,张菊梅,等. 二氧化氯对大肠杆菌作用机理的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2007, 24(1): 16-20.
- [7] Packey CD, Shanahan MT, Manick S, et al. Molecular detection of bacterial contamination in gnotobiotic rodent units[J]. Gut Microbes, 2014, 4(5): 361-370.
- [8] 孙薇,任清明,李东力. 酸性氧化电位水杀菌机理及应用研究进展[J]. 中国消毒学杂志, 2004, 21(4): 371-373.
- [9] Zeng X, Tang W, Ye G, et al. Studies on disinfection mechanism of electrolyzed oxidizing water on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*[J]. J Food Sci, 2010, 75(5): M253-M260.

(本文编辑:文细毛)