

网络出版时间:2020-04-17 16:26 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.10.003
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200417.1316.006.html

氯甲酚纳米乳消毒剂对真菌的杀菌作用

银梅,张道亮,孙延举,李香会,李怡颖,徐盼,薛梦晴,金梦云,杨雪峰

(河南科技学院 动物科技学院,河南 新乡 453003)

【摘要】【目的】研究氯甲酚纳米乳消毒剂(CND)对真菌的杀菌效果及其作用机理。【方法】以白色念珠菌为指示菌,分别利用营养肉汤稀释法、悬液定量杀菌试验法、物体表面消毒模拟现场试验法、扫描和透射电子显微镜观察法,研究 CND 的体外抗菌活性、杀菌效果、模拟现场消毒效果及对真菌超微结构的影响。【结果】CND 对白色念珠菌的 MIC 和 MBC 均为 3 mg/mL。对白色念珠菌的杀菌效果随着其体积分数的增大和作用时间的延长而增强,体积分数 0.5% CND 作用 15 min、0.6% CND 作用 10 min 和 0.8% CND 作用 5 min 时,消毒合格;0.8% 和 1.0% CND 分别作用 10 和 5 min 时,杀菌率均为 100%。体积分数 0.2% 和 0.5% CND 的杀菌率极显著高于相同体积分数的氯甲酚溶液($P < 0.01$),二者体积分数为 1.0% 时差异不显著($P > 0.05$)。经体积分数 0.8% CND 作用 10 min 后,扫描电镜下白色念珠菌表面粗糙不平,皱褶明显,部分菌体表面出现裂缝;透射电镜下菌体形状发生改变,细胞壁变薄,且部分细胞壁局部有断裂或破损,部分真菌的细胞膜和细胞核边界不清,结构模糊,多数真菌的细胞质内部构造不清,不同真菌之间的胞浆内电子密度不同。【结论】CND 对真菌的杀菌作用强,并能使白色念珠菌的超微结构发生改变。

【关键词】 氯甲酚纳米乳;消毒剂;白色念珠菌;杀菌作用;超微结构

【中图分类号】 TQ450.4⁺5

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2020)10-0018-06

Fungicidal effect of chlorocresol nanoemulsion disinfectant

YIN Mei,ZHANG Daoliang,SUN Yanju,LI Xianghui,LI Yiying,XU Pan,
XUE Mengqing,JIN Mengyun,YANG Xuefeng

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: 【Objective】 The aim of this paper was to study the fungicidal effect and mechanism of chlorocresol nanoemulsion disinfectant (CND). 【Method】 Taking *Candida albicans* as the indicator fungus, the nutritional broth dilution method, suspension quantitative fungicidal test, object surface disinfection simulation field test, observational method with scanning and transmission electron microscope were used to investigate the *in vitro* antifungal activity, fungicidal action, field simulation effect of CND and fungal ultrastructural changes caused by CND. 【Result】 MIC and MBC of CND against *Candida albicans* were both 3 mg/mL. The fungicidal action increased with the increase of CND concentration and the extension of disinfection time. The disinfection was qualified when the volume fractions of 0.5%, 0.6% and 0.8% CND were acted for 15, 10 and 5 minutes, respectively. When 0.8% and 1.0% CND were disinfected for 10 and 5 minutes, the fungicidal rate was 100%. The fungicidal rates of volume fractions of 0.2% and 0.5% CND were significantly higher than that of cloccresol solution ($P < 0.01$), while the difference was not significant at the volume fraction of 1.0% ($P > 0.05$). After *Candida albicans* was treated by volume fraction of

【收稿日期】 2019-09-23

【基金项目】 河南科技学院“标志性创新工程”计划经费项目(2015ZD09);河南省高等学校大学生创新训练计划项目(S20191-0467006);河南科技学院大学生创新训练计划项目(2019CX084)

【作者简介】 银梅(1973-),女(蒙古族),内蒙古兴安盟人,副教授,硕士,硕士生导师,主要从事兽医分子病理学研究。
E-mail:547633486@qq.com

【通信作者】 杨雪峰(1973-),女,河南泌阳人,教授,博士,主要从事兽医药理学研究。E-mail:yangxuefeng2003@126.com

0.8% CND for 10 min, the surface was rough with obvious wrinkles, and cracks appeared on the surface under scanning electron microscope. Under transmission electron microscope, the shape changed with thinner and partially broken or locally damaged cell walls. The boundary of cell membrane and nucleus were unclear and the structure was ambiguous. The internal cytoplasm construction of most fungi was not clear. Different fungi had different electron densities in cytoplasm. 【Conclusion】 CND had strong fungicidal effect on fungi and could change ultrastructure of *Candida albicans*.

Key words: chlorocresol nanoemulsion; disinfectant; *Candida albicans*; fungicidal action; ultrastructure

集约化、规模化养殖可降低经营成本,提高经济效益,实现高效管理,已成为养殖业发展的大趋势,但由此也带来了高密度养殖环境下病原微生物导致的环境恶化和各类疾病发生风险增加等问题。资料表明,动物养殖环境中的大量真菌及孢子,通过气溶胶经呼吸道或伤口进入人和动物体内,可引起各种疾病^[1-2]。近年来,侵袭性真菌感染特别是白色念珠菌感染所致的发病率和死亡率逐年升高^[3],而环境消毒可有效遏制真菌性疾病的传播和发生^[1]。

氯甲酚(Chlorocresol)是一种酚类衍生物消毒剂,主要适用于畜禽栏舍、车辆、器物及环境等消毒^[4-6],但由于其微溶于水、有酚的特臭味^[4]等缺点,制约了其作为消毒剂产品的开发与临床应用。依据《兽药质量标准》(2017版,化学药品卷),氯甲酚现有制剂为氯甲酚溶液^[7]。氯甲酚纳米乳消毒剂(Chlorocresol Nanoemulsion Disinfectant, CND)是本课题组以氯甲酚为原料研制的一种新型环境消毒剂,具有水溶性好、酚臭味弱、消毒作用强、生产工艺简单等优点^[8]。前期研究表明,CND对大肠杆菌具有较强的杀灭作用^[9],但目前本课题组尚未就该消毒剂对真菌的杀菌效果及机制进行系统研究。本试验以白色念珠菌为真菌代表菌,研究了CND对真菌的杀菌效果及对真菌超微结构的影响,以期为其在临床中的推广应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验菌 白色念珠菌 ATCC 10231,由河南科技学院基础兽医学实验室保存。

1.1.2 主要试剂及培养基 氯甲酚,国药集团化学试剂有限公司,批号 20121115;吐温(Tween)-80,天津市瑞金特化学品有限公司;牛血清白蛋白,盐城赛宝生物科技有限公司。

沙堡琼脂培养基:蛋白胨 10 g,葡萄糖 40 g,蒸馏水 1 000 mL,将上述成分混合后加热充分溶解,调 pH 至 5.6 ± 0.2 ,分装后于 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌 30

min,备用。沙堡琼脂培养基:在上述沙堡液体培养基成分中加入 20 g 琼脂,同上处理后备用。CND 参考文献[9]自制,使用时用蒸馏水稀释至所需浓度。

1.1.3 主要仪器 生化培养箱, SHP-250 型,上海三发科学仪器有限公司;超净工作台, SW-CJ-2FD 型,苏州净化设备有限公司;扫描电镜, JSM-6390 型,日本 JEOL 公司;透射电镜, H-7500 型,日本 Hitachi 公司;制备型超速离心机, OptimaL-100K 型, BECKMAN 公司。

1.2 方 法

1.2.1 CND 中和剂的筛选鉴定 筛选合适的中和剂是对消毒剂消毒效果进行准确评价的第一步^[10]。依据《消毒技术规范》^[11],本研究分别以 3%吐温-80 磷酸盐缓冲液(PBS)、0.5%硫代硫酸钠 PBS、1%吐温-80+1%卵磷脂+0.5%硫代硫酸钠 PBS 为中和剂(均为体积分数)进行鉴定试验,为 CND 杀菌效果的后续研究筛选适宜的中和剂。

试验菌悬液白色念珠菌的密度为 $2\ 500 \sim 15\ 000\ \text{CFU/mL}$, CND 体积分数为 1.0%。参考文献[9],将试验分为 8 组: I 组,消毒剂+菌悬液; II 组,(消毒剂+菌悬液)+中和剂; III 组,中和剂+菌悬液; IV 组,(消毒剂+中和剂)+菌悬液; V 组,稀释液(PBS)+菌悬液; VI 组,培养基(沙堡琼脂培养基); VII 组,稀释液; VIII 组,中和剂。具体操作参考《消毒技术规范》中的中和剂悬液定量鉴定试验操作程序进行^[11]。试验重复 3 次,计数各组的平均活菌密度,并计算 III、IV、V 组的组间菌落数误差率。当 III、IV、V 组有相似量试验菌生长,且组间菌落数误差率 $< 15\%$ 时,表明所选的中和剂及其浓度比较合适,能作为该消毒剂的中和剂。其中,组间菌落数误差率 = $[(\text{III、IV、V 3 组的平均活菌密度} - \text{各组的平均活菌密度}) \text{的绝对值之和} / \text{III、IV、V 3 组的平均活菌密度之和}] \times 100\%$ 。

1.2.2 CND 体外抗菌活性的测定 利用营养肉汤稀释法^[11]测定 CND 对白色念珠菌的最小抑菌浓度

(Minimal Inhibitory Concentration, MIC), 具体操作如下:(1)将CND用蒸馏水分别稀释成3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0 mg/mL系列质量浓度的试验液,然后各取2.5 mL分别加入到2.5 mL沙堡液体培养基试管中。(2)将0.1 mL密度约为 10^8 CFU/mL的白色念珠菌悬液接种到含不同质量浓度消毒剂的沙堡液体培养基试管中,将其作为试验组(消毒剂质量浓度分别为1.5,2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0 mg/mL)。(3)以相同的方法把白色念珠菌接种到不含消毒剂的沙堡液体培养基试管里,将其作为阳性对照。同时另取1支只含沙堡液体培养基的试管,将其作为阴性对照。(4)试验组、阳性对照组及阴性对照组均培养72 h,肉眼观察并记录试验结果。(5)肉眼观察试验组中无菌生长的最低消毒剂浓度即为CND对白色念珠菌的MIC。同时,从肉眼观察无菌生长的各试验组试管中取出1 mL试验菌液,分别接种至不含消毒剂的琼脂培养基上进行培养,72 h后观察是否有菌生长,无菌生长的最小消毒剂浓度即为CND对该菌的最小杀菌浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)。(6)试验重复5次,取众数为MIC值和MBC值^[12]。

1.2.3 CND对真菌的杀灭效果 利用悬液定量杀菌试验方法^[12-13],研究CND对白色念珠菌的杀灭效果。试验分为阴性对照组、阳性对照组及体积分数分别为0.5%,0.6%,0.8%和1.0% CND的试验组,试验组消毒剂的作用时间分别为5,10和15 min。

悬液定量杀菌试验方法如下:(1)采用无菌操作,在试管中依次加入0.5 mL $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ CFU/mL试验菌悬液和0.5 mL体积分数为3%牛血清蛋白混匀,置 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ 水浴中5 min后,吸取一定质量浓度消毒液4.0 mL注入其中,迅速混匀并立即计时。(2)待试验菌与消毒剂二者相互作用至预定时间,吸取0.5 mL加入4.5 mL中和剂中,混匀并作用10 min后,再吸取1.0 mL进行活菌计数,计算各组的活菌浓度。(3)同时,用硬水代替消毒液进行平行试验,作为阳性对照,用同批次的相关溶液和培养基作为阴性对照。(4)试验重复3次,计算杀灭效果(杀灭效果=阳性对照组平均活菌浓度的常用对数值-试验组活菌浓度的常用对数值)。当杀灭效果 ≥ 4.00 时,判定为消毒合格。

1.2.4 物体表面消毒模拟试验 以木质桌面为代表,以白色念珠菌($1.25 \times 10^7 \sim 1.25 \times 10^8$ CFU/mL)样本为试验菌悬液,试验分为阴性对照组、阳性

对照组、CND试验组、氯甲酚溶液试验组,其中两试验组的消毒剂体积分数分别设为0.2%,0.5%和1.0%;消毒剂作用时间均为10 min。参考文献^[11],利用物体表面消毒模拟现场鉴定试验方法进行评价,具体操作如下:(1)分别用2种不同体积分数的消毒剂对木质桌面表面进行涂抹消毒,作用10 min时,将无菌棉拭在含10 mL中和剂溶液试管中浸湿,并于管壁上挤干后对消毒区块进行涂抹采样。最后无菌操作将采样端剪入原中和剂溶液试管内,充分混匀后进行真菌培养计数。(2)将无菌棉拭在含10 mL PBS稀释液试管中浸湿,于管壁上挤干后对对照组区块涂抹采样,无菌操作将棉拭采样端剪入原稀释液试管内,充分混匀并适当稀释后培养计数。(3)将同批次的中和剂溶液、稀释液、棉拭、培养基等培养计数,作为阴性对照。(4)分别计算CND和氯甲酚溶液的杀菌率,用“平均数±标准差”表示,采用SPSS 10.0统计软件进行统计分析。

1.2.5 CND对白色念珠菌超微结构的影响 (1)样品前处理。取5 mL 1.2.3中的白色念珠菌悬液加至45 mL体积分数0.8% CND中,混合均匀,作用10 min时,快速加入450 mL中和剂混匀,作用10 min,然后 4°C 、6 000 r/min离心3 min,弃上清,取下层的菌体沉淀用PBS液清洗、离心3次后,留沉淀备用。对照组用PBS代替CND,其他处理相同。试验组和对照组样品均一分为二,分别用于扫描和透射电子显微镜的观察。

(2)扫描电子显微镜样品的制备与观察。上述菌体沉淀加入体积分数2.5%戊二醛重悬、固定, 4°C 过夜,再于 4°C 、6 000 r/min离心3 min,弃上清,留沉淀,然后分别用体积分数30%,50%,70%,80%,90%,100%梯度酒精脱水8 min,再用100%酒精重悬8 min后在载玻片上匀涂1滴,自然晾干,最后喷金,扫描电子显微镜下观察消毒剂作用前后白色念珠菌的形态变化并拍照。对照组样本进行相同处理。

(3)透射电子显微镜观察样品的制备与观察。上述菌体沉淀加入体积分数2.5%戊二醛进行预固定,然后用体积分数1%锇酸进行后固定,再依次在50%乙醇中脱水20 min、70%乙醇中脱水过夜、90%乙醇中脱水20 min、90%乙醇中脱水过夜、90%丙酮与菌悬液1:1(体积比)混合20 min、90%丙酮(均为体积分数)脱水20 min,然后树脂包埋,制备成超薄切片,醋酸双氧铀-柠檬酸铅溶液染色后置透射电镜下观察并拍照。对照组样本作同样处

理。

2 结果与分析

2.1 CND 中和剂的筛选鉴定

由表 1 可知,以体积分数 3%吐温-80 PBS 为中和剂时,Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ组间菌落数误差率为 7.56%,小

于另外 2 种中和剂的组间菌落数误差率。说明体积分数 3%吐温-80 PBS 可有效中和 CND 对白色念珠菌的残余作用,中和剂及其中和产物对白色念珠菌和培养基无不良影响。据此,筛选出 CND 对白色念珠菌的适宜中和剂为体积分数 3%吐温-80 PBS。

表 1 CND 中和剂筛选鉴定试验结果

Table 1 Neutralizer selection and evaluation for CND

中和剂 Neutralizer	各组的平均活菌密度/(CFU · mL ⁻¹) Average viable density of each group								Ⅲ、Ⅳ和Ⅴ组间 菌落数误差率/% Colony error rate among groups Ⅲ, Ⅳ and Ⅴ
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
3%吐温-80 PBS 3% Tween-80 PBS	0	0	9 000	7 500	7 750	0	0	0	7.56
0.5%硫代硫酸钠 PBS 0.5% Sodium thiosulfate PBS	0	10	9 000	5 500	7 750	0	0	0	17.23
1%吐温-80+1%卵磷脂+ 0.5%硫代硫酸钠 PBS 1% Tween-80+1% lecithin+ 0.5% sodium thiosulfate PBS	0	10	8 000	5 500	7 750	0	0	0	14.90

2.2 CND 的体外抗菌活性

CND 对白色念珠菌生长的影响结果显示,阳性对照组和 CND 1.5~2.5 mg/mL 组均可见真菌生长,CND 3.0~5.0 mg/mL 组、阴性对照组均未见白色念珠菌生长,表明 CND 对白色念珠菌的 MIC 为 3 mg/mL。对 CND 3.0~5.0 mg/mL 组试管液体进行培养,结果均未见菌生长,表明该消毒剂对白色念珠菌的 MBC 为 3 mg/mL。

2.3 CND 对真菌的杀灭效果

由表 2 可知,随着 CND 体积分数的增大和作用时间的延长,其对白色念珠菌的杀灭效果不断增强。当体积分数 0.5% CND 作用 15 min、0.6% CND 作用 10 min 和 0.8% CND 作用 5 min 时,其杀灭效果均 >4,消毒合格;当体积分数 0.8% 消毒剂作用 10 min 以上时,白色念珠菌全部被杀灭,即 CND 的杀菌率为 100%;体积分数 1.0% CND 能全部杀灭真菌。结果提示,CND 对真菌的杀灭效果较好。

表 2 CND 对白色念珠菌的杀灭效果

Table 2 Fungicidal effect of CND against *Candida albicans*

消毒剂体积分数/% Volume fraction of disinfectant	不同时间杀灭效果 Fungicidal effect for different time		
	5 min	10 min	15 min
0.5	3.59	3.86	4.06
0.6	3.84	4.99	5.46
0.8	5.06	≥7.46	≥7.46
1.0	≥7.46	≥7.46	≥7.46

注:阳性对照组活菌数对数值为 7.46。

Note:Log value of live fungi was 7.46 in the positive control group.

2.4 CND 对物体表面消毒模拟现场的杀菌效果

由表 3 可知,CND 对物体表面消毒模拟现场的杀菌效果随其体积分数的增大而增强;体积分数 0.2%和 0.5% CND 的杀菌率极显著高于相同体积分数的氯甲酚溶液 ($P < 0.01$);体积分数 1.0% CND 的杀菌率较相同剂量氯甲酚溶液的杀菌率高,但差异不显著 ($P > 0.05$)。结果表明,与同剂量常规剂型的氯甲酚溶液相比,CND 对物体表面消毒模拟现场的杀菌效果较好。

表 3 2 种氯甲酚消毒剂对物体表面消毒模拟现场的平均杀菌率

Table 3 Average fungicidal rates of two chlorcresol disinfectants for surface disinfection %

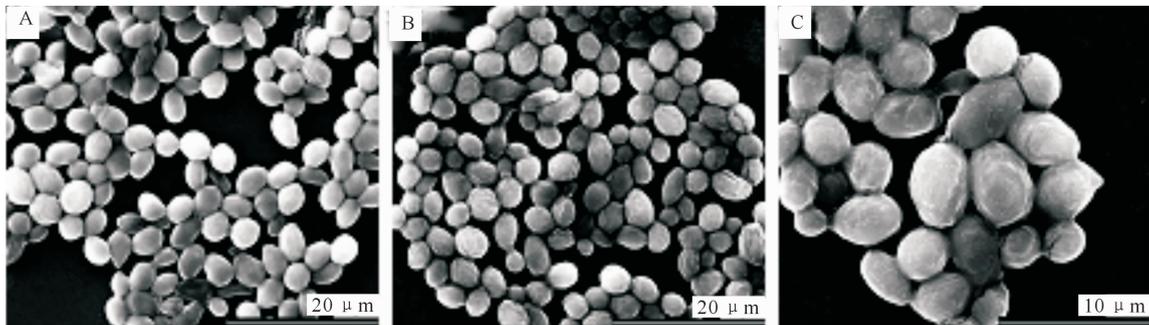
消毒剂体积分数/% Volume fraction of disinfectant	CND	氯甲酚溶液 Chlorcresol solution
0.2	98.53±0.20	80.66±0.91**
0.5	99.82±0.05	91.40±0.62**
1.0	99.93±0.02	97.32±0.32

注:**表示相同剂量的 2 种消毒剂之间差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note:** indicates the significant difference between disinfectants at same concentrations ($P < 0.01$).

2.5 CND 对白色念珠菌细胞超微结构的影响

2.5.1 扫描电镜观察 白色念珠菌的扫描电镜观察结果见图 1。正常白色念珠菌呈卵圆形或椭圆形,生长良好,表面光滑,细胞完整,可见有细胞出芽繁殖(图 1-A);CND 作用 10 min 后,菌体表面结构有明显变化,菌体表面粗糙,凹凸不平,呈明显的皱褶状,部分菌体细胞表面出现裂缝(图 1-B、C)。



A. 对照组($\times 3\ 000$);B. CND 作用 10 min($\times 3\ 000$);C. CND 作用 10 min($\times 6\ 000$)

A. Control group ($\times 3\ 000$);B. Disinfected with CND for 10 min ($\times 3\ 000$);C. Disinfected with CND for 10 min ($\times 6\ 000$)

图 1 CND 对白色念珠菌细胞超微结构影响的扫描电镜观察

Fig. 1 Scanning electron microscope observation of CND effect on ultrastructure of *Candida albicans*

2.5.2 透射电镜观察 由图 2 可见,正常白色念珠菌呈卵圆形或椭圆形,细胞壁结构完整且较厚,细胞膜结构完整,不同真菌细胞间的胞浆内电子密度均匀,可观察到细胞内的细胞核,且细胞核异染色质浓染,核膜完整,胞核易辨认(图 2-A)。CND 作用 10 min 后,透射电镜观察(图 2-B、C)显示,白色念珠菌

的形状发生了改变,主要呈卵圆形、椭圆形或长椭圆形;细胞壁较正常白色念珠菌薄,部分真菌细胞的细胞壁结构不完整,局部有断裂、缺损或破损碎片;有的菌体细胞膜和细胞核边界不清,结构模糊;多数菌体细胞质内部构造不清;不同真菌之间的胞浆内电子密度不同,有的升高,有的降低。



A. 对照组($\times 2\ 500$);B. CND 作用 10 min($\times 2\ 500$);C. CND 作用 10 min($\times 4\ 000$)

A. Control group ($\times 2\ 500$);B. Disinfected with CND for 10 min ($\times 2\ 500$);C. Disinfected with CND for 10 min ($\times 4\ 000$)

图 2 CND 对白色念珠菌细胞超微结构影响的透射电镜观察

Fig. 2 Transmission electron microscope observation of CND effect on ultrastructure of *Candida albicans*

3 讨论与结论

随着养殖业的迅猛发展,畜禽的真菌性疾病越来越普遍,尤以由白色念珠菌引起的疾病较多。白色念珠菌是最常见的条件致病菌,在检出的致病性真菌中占首位^[14]。因此,研究如何控制这类致病性真菌的意义重大。

为准确评价 CND 对真菌的杀灭效果,本试验首先研究了 CND 对白色念珠菌的体外抗菌活性和杀菌效果。结果表明,CND 对白色念珠菌的 MIC 和 MBC 均为 3 mg/mL;对白色念珠菌的杀灭效果随着其体积分数的增大和作用时间的延长而增强,体积分数 0.8% CND 作用 5 min 即消毒合格,作用 10 min 以上时,杀菌率为 100%,1.0% CND 作用 5 min 即能全部杀灭真菌。不同的微生物对同一种消

毒剂的敏感性不同。本课题组的前期研究表明,体积分数 0.08% CND 对大肠杆菌作用 5 min 时消毒合格,0.1% CND 作用 5 min 时则可全部杀灭大肠杆菌^[9]。由此可见,CND 对白色念珠菌的敏感性没有对大肠杆菌的敏感性高。这可能主要是由于真菌细胞壁的主要成分与细菌细胞壁的主要成分不同所致。因此,临床上用 CND 进行全面彻底消毒时,应适当提高消毒剂浓度。本试验结果还表明,CND 较同剂量常规剂型的氯甲酚溶液对物体表面消毒模拟现场的效果好,二者在体积分数同为 0.2% 和 0.5% 时均差异极显著($P < 0.01$),1.0% 时差异不显著($P > 0.05$)。大量资料表明,纳米乳是一种理想药物载体,并具有其他药物载体所不可比拟的优势,如能提高难溶性药物的溶解度,就能提高药物的生物利用度,进而可促进药物的透皮吸收等^[15-19]。本试

验中的 CND 就是以纳米乳为药物载体研制出的一种新剂型,其杀真菌效果较常规剂型氯甲酚强的原因,可能主要就是由纳米乳这一特殊药物载体实现的。CND 为水包油型纳米乳^[8-9],氯甲酚被包裹于纳米乳中,形成的纳米级药物粒径小,易透过真菌的细胞壁,从而增加了菌体内的药物浓度,增强了药物的杀菌作用。本试验结果提示,CND 对真菌的杀灭效果好,值得在临床中推广应用。

为研究 CND 对真菌的杀菌作用机制,本试验通过悬液定量杀菌试验研究了体积分数 0.8% CND 对白色念珠菌超微结构的影响。扫描电镜下观察发现,用 CND 处理 10 min 后,菌体表面皱褶明显,部分出现裂缝;透射电镜下,菌体形状发生改变,细胞壁、细胞膜、细胞质、细胞核等结构均有不同程度的变化。结果表明,CND 可通过破坏真菌的细胞结构完整性而发挥杀菌作用。细胞壁是真菌细胞的特殊结构,它不但是真菌细胞防御外界侵袭的首道屏障,而且在维持菌体形态、保护菌体免受外界损伤以及介导菌体粘附于宿主细胞等方面也发挥着重要作用^[3]。资料表明,细胞壁、细胞膜一旦受损,真菌就不能维持其固有形态,细胞内外物质交换将会受到阻碍,结合于胞膜上的各种酶也不能正常发挥作用,导致真菌细胞对营养物质的吸收降低,生物大分子合成受阻^[20]。本试验结果提示,CND 对白色念珠菌的杀菌作用机制可能是其能致菌体的超微结构发生改变,但是否还有其他作用机制尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] 郭 耀,张艳冰,高晓莎,等. 过氧化乙酸戊二醛复方消毒剂对羊舍环境真菌的消毒效果评价 [J]. 中国动物检疫,2018,35(5):98-102.
Guo Y,Zhang Y B,Gao X S, et al. Effect evaluation of peroxy acetic acid glutaraldehyde compound disinfectant on environmental fungi in sheep houses [J]. China Animal Health Inspection,2018,35(5):98-102.
- [2] 谈书勤,胡贵方,顾大勇. 空气微生物气溶胶富集、检测与空气消毒技术研究进展 [J]. 中国消毒学杂志,2012,29(12):1115-1120.
Tan S Q,Hu G F,Gu D Y. Research progress on air microbial aerosol enrichment, detection and air disinfection technology [J]. Chinese Journal of Disinfection,2012,29(12):1115-1120.
- [3] 黄 悦,张子平,程 波. HOG1 基因对白念珠菌超微结构的影响 [J]. 中国真菌学杂志,2010,5(1):13-16.
Huang Y,Zhang Z P,Cheng B. Influence of HOG1 gene on ultrastructure of *Candida albicans* [J]. Chin J Mycol,2010,5(1):13-16.
- [4] 胡功政,邱银生. 家禽常用药物及其合理使用 [M]. 郑州:河南科学技术出版社,2010:27.
- [5] Hu G Z,Qiu Y S. Medicines commonly used in poultry and their rational use [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press,2010:27.
- [5] 胡功政,李荣誉. 新全兽医手册 [M]. 郑州:河南科学技术出版社,2015:31.
Hu G Z,Li R Y. New complete veterinary manual [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press,2015:31.
- [6] 李春雨,贺生中. 动物药理 [M]. 北京:中国农业大学出版社,2007:101.
Li C Y,He S Z. Animal pharmacology [M]. Beijing: China Agricultural University Press,2007:101.
- [7] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准(2017 版. 化学药品卷) [S]. 北京:中国农业出版社,2017:306-307.
Chinese Veterinary Drug Code Committee. Veterinary drug quality standards (2017 ed. Chemical drugs volume) [S]. Beijing: China Agricultural Press,2017:306-307.
- [8] 杨雪峰,李任峰,任秀娟,等. 一种氯甲酚纳米乳消毒剂及其制备方法 [P]. 中国:201510074247. 2,2015-07-01.
Yang X F,Li R F,Ren X J, et al. A chlorocresol nanoemulsion disinfectant and its preparation method [P]. China:201510074247. 2,2015-07-01.
- [9] Yang X F,Sun Y W,Mu S Y, et al. Evaluation of characterization and disinfection efficacy of chlorocresol nanoemulsion disinfectant [J]. RSC Advances,2016,6(16):12730-12736.
- [10] Sheraba N S,Yassin A S,Fahmy A, et al. Efficacy and toxicity of neutralizers against disinfectants and antiseptics used in vaccine production facility [J]. Afr J Microbiol Res,2012,6(36):6565-6571.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范 [S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2008:21-52.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Technical standard for disinfection [S]. Beijing: Ministry of Health of the People's Republic of China,2008:21-52.
- [12] 杨雪峰,齐永华,宁红梅,等. 恩诺沙星纳米乳的制备及其质量评价 [J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2012,38(6):693-699.
Yang X F,Qi Y H,Ning H M, et al. Preparation and quality evaluation of enrofloxacin nanoemulsion [J]. Journal of Zhejiang University (Agric&Life Sci),2012,38(6):693-699.
- [13] 刘远飞. 氟喹诺酮类抗菌药后效应及其机制的研究 [D]. 哈尔滨:东北农业大学,2002.
Liu Y F. Studies on the post-antibiotic effects of Fluoroquinolones and mechanism [D]. Harbin: Northeast Agricultural University,2002.
- [14] 任志欣,李东霞,杨丽敏. 蒙药大花葵对白色念珠菌的试验研究 [J]. 中国民族医药杂志,2017(2):68-69.
Ren Z X,Li D X,Yang L M. Experimental study on *Candida albicans* in Mongolian medicine dahua anemone [J]. Chinese Journal of Ethnic Medicine,2017(2):68-69.

- [39] Xiong W, Matthews R, Holman I, et al. Modelling China's potential maize production at regional scale under climate change [J]. *Climatic Change*, 2007, 85(3/4): 433-451.
- [40] 李彦昌,王海亮,王昌亮,等. 黄淮海玉米育种的密度选择探讨 [J]. *中国种业*, 2019(4): 45-47.
Li Y C, Wang H L, Wang C L, et al. Discussion on density selection of maize breeding in Huang-Huai-Hai [J]. *China Seed Industry*, 2019(4): 45-47.
- [41] 王鹏文,戴俊英,赵桂坤,等. 玉米种植密度对产量和品质的影响 [J]. *玉米科学*, 1996, 4(4): 43-46.
Wang P W, Dai J Y, Zhao G K, et al. Research on high yield and good quality of maize [J]. *Journal of Maize Sciences*, 1996, 4(4): 43-46.
- [42] Wang X H, Peng L Q, Zhang X P, et al. Divergence of climate impacts on maize yield in Northeast China [J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2014, 196: 51-58.
- [43] 吕 妍,王让会,蔡子颖. 我国干旱半干旱地区气候变化及其影响 [J]. *干旱区资源与环境*, 2009, 23(11): 65-70.
Lü Y, Wang R H, Cai Z Y. Climate change and influence in arid and semi-arid area of China [J]. *Journal of Arid Land Resource and Environment*, 2009, 23(11): 65-70.
- [44] Liu Z J, Hubbard K G, Lin X M, et al. Negative effect of climate warming on maize yield are reversed by changing sowing date and culture selection in Northeast China [J]. *Global Change Biology*, 2013, 19(1): 3481-3492.
- [45] 吕 硕,杨晓光,赵 锦,等. 气候变化和品种更替对东北地区春玉米产量潜力的影响 [J]. *农业工程学报*, 2013, 29(18): 179-190.
Lü S, Yang X G, Zhao J, et al. Effects of climate change and variety alternative on potential yield of spring maize in Northeast China [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2013, 29(18): 179-190.
- [46] Wang J, Wang E L, Yang X G, et al. Increased yield potential of wheat-maize cropping system in North China Plain by climate change adaptation [J]. *Climate Change*, 2012, 13(3/4): 825-840.

(上接第 23 页)

- [15] Jaiswal, M, Dudhe R, Sharma P K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system [J]. *Biotech*, 2015, 5(2): 123-127.
- [16] Ali A, Ansari V A, Ahmad U, et al. Nanoemulsion: an advanced vehicle for efficient drug delivery [J]. *Drug Res*, 2017, 67(11): 617-631.
- [17] Singh Y, Meher J G, Raval K, et al. Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery [J]. *J Control Release*, 2017, 252: 28-49.
- [18] Yukuyama M N, Kato E T, Lobenberg R, et al. Challenges and future prospects of nanoemulsion as a drug delivery system [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(3): 495-508.
- [19] 杨雪峰,韩庆功,郑爱武,等. 甲酚纳米乳消毒剂的质量评价及消毒功效研究 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(3): 23-27.
Yang X F, Han Q G, Zheng A W, et al. Quality evaluation and disinfection efficacy of cresol nanoemulsion disinfectant [J]. *Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed)*, 2016, 44(3): 23-27.
- [20] 吴秀珍,傅颖媛,李剑平,等. 黄芩苷对白色念珠菌超微结构的影响 [J]. *江西医学院学报*, 2007, 47(4): 89-90.
Wu X Z, Fu Y Y, Li J P, et al. Effect of baicalin on the ultrastructure of *Candida albicans* [J]. *Journal of Jiangxi Medical University*, 2007, 47(4): 89-90.