

不同抑制剂对地衣芽孢杆菌生长影响的研究

刘天贵 胡尚勤

(重庆师范学院生物系 重庆 400047)

摘要: 报道了地衣芽孢杆菌对不同抑制剂的反应。结果表明,当 pH 在 7.0 时,链霉素浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$,青霉素浓度 1000 $\mu\text{g/mL}$,头孢唑啉钠浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 时对地衣芽孢杆菌有明显抑制作用。这对正确使用地衣芽孢杆菌制剂(整肠生)提供了可靠的理论依据。

关键词: 抑制剂,地衣芽孢杆菌

中图分类号: Q93-335 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0349-04

THE EFFECT OF INHIBITOR VARIATIONS ON THE GROWTH OF *BACILLUS LICHENIFORMIS*

LIU Tian-Gui HU Shang-Qin

(Dept. of Biology, Teachers College, Chongqing 400047)

Abstract: This paper reports reaction of *Bacillus licheniformis* on the inhibitor variations. The result Shows that, inhibition of the 500 $\mu\text{g/mL}$ of cephalosporin, 1000 $\mu\text{g/mL}$ of penicillin, 500 $\mu\text{g/mL}$ of streptomycin, on the *Bacillus Licheniformis*, Whe the Phis 7.0. This provides a sicientific basis for using the preparation of *Bacillus licheniformis*.

Key words: Inhibitor, *Bacillus licheniformis*.

1992 年问世的“整肠生”制剂的生产菌种—地衣芽孢杆菌(*Bacillus Licheniformis*),是我国自己分离出来并用于生产的一个新的菌株。它有调节微生态平衡,治疗肠炎,腹泻等多种作用,它的消长受到多种因素的影响。但据目前检索的医学和微生物学文献资料和国家专利局检索的资料中尚无此类研究报道。本研究旨在探讨部分抗菌素类抑制剂对地衣芽孢杆菌生长的影响,为更好地利用该菌剂及该菌剂在治疗作用与机制方面研究提供科学资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种及来源:地衣芽孢杆菌(*Bacillus*

Licheniformis)由重庆师范学院应用微生物研究室提供。

1.1.2 培养基:牛肉膏 3g,蛋白胨 10g, NaCl 5g,琼脂 20g(液体不用)定容至 1L, pH7.0, $1 \times 10^5 \text{Pa}$, 灭菌 30min^[1]。

1.1.3 药品及仪器设备:链霉素、青霉素、头孢唑啉钠, NaCl、NaOH、 KH_2PO_4 、 K_2HPO_4 、苯酚等。干燥箱、 PH_5 -G 型酸度计、万分之一电光分析天平、培养箱、水浴锅、超净工作台等。

1.2 方法

1.2.1 缓冲液的配制^[2]: pH6.0 的磷酸缓冲液的配制,准确称取 KH_2PO_4 40g 和 K_2HPO_4 1.0g 于

500mL 容量瓶中,用蒸销水定容至刻度,0.70 × 10⁵Pa,灭菌 10min.

1.2.2 各种浓度抗菌素抑制剂的配制:精确称取 0.25g 和 0.05g 链霉素分别用 pH6.0 的无菌磷酸缓冲液定容于两个 25mL 容量瓶中,即得 10000μg/mL 的链霉素液各 25mL. 然后再分别用磷酸缓冲液稀释成为 200μg / mL, 300μg/mL, 500μg/mL, 1000μg/mL, 2000μg/mL, 3000μg/ mL, 4000μg/mL, 5000μg/mL, 6000μg/mL, 7000μg / mL和 50μg / mL, 70μg / mL, 90μg / mL, 150μg/mL. 用同样方法把青霉素、头孢唑啉钠配成同样浓度. 同样将苯酚配成 0.1%、0.5%、1%、2%、4% 的不同浓度.

1.2.3 将牛肉膏蛋白胨培养基配成 pH 值为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 7 种不同的固体和液体

培养基,1 × 10⁵Pa,灭菌 30min 后冷到 45℃ 时,分别加入上述青霉素、链霉素、头孢唑啉钠各 15 种浓度和苯酚 5 种浓度,共计 700 种处理.

1.2.4 接种培养:在各种培养基中分别接种 1.1 × 10⁶个菌体,混匀后,固体倒平板培养,液体试管培养,37℃ 培养 24h, 然后观察计算菌数^[3].

1.2.5 分析测试方法:用光电菌落计数器平板菌落计数法计算活菌数和用显微镜直接计数法计数总菌数.

2 结果与讨论

2.1 不同抑制剂在 pH7.0 的固体琼脂平板上对菌落生长的影响
结果见表 1.

表1 不同抑制剂对地衣芽孢杆菌生长的作用

抑制剂浓度	地衣芽孢杆菌增长量(个/m)			
	链霉素	青霉素	头孢唑啉	苯酚
0.0μg/mL(对照)	7.1×10 ⁷	7.1×10 ⁷	7.1×10 ⁷	7.1×10 ⁷
50μg/mL	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁶	
70μg/mL	1.1×10 ⁵	1.1×10 ⁵	1.1×10 ⁵	
90μg/mL	1.1×10 ⁵	1.1×10 ⁵	1.1×10 ⁵	
100μg/mL	1.1×10 ⁴	1.1×10 ⁴	1.1×10 ⁴	
150μg/mL	1.1×10 ⁴	1.1×10 ⁴	1.1×10 ⁴	
200μg/mL	1.1×10 ³	1.1×10 ³	1.1×10 ³	
300μg/mL	0.1×10	1.1×10 ²	1.1×10	
500μg/mL	0.0×10	1.1×10	0.0×10	
1000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
2000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
3000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
5000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
6000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
7000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
0.1%				1.1×10 ⁶
0.5%				1.1×10 ⁵
1.0%				1.1×10 ⁴
2.0%				1.1×10 ³
3.0%				1.1×10 ²
4.0%				1.1×10

从表 1 可看出,当链霉素在 500μg / mL或以上时,地衣芽孢杆菌已经被抑制不能生长(看不

见菌落)了,青霉素在此无作用,在 1000μg/mL或以上时能抑制该菌生长. 头孢唑啉在 500μg/mL

或以上时能抑制生长。苯酚在 0.4% 以下均无抑制作用。

对地衣芽孢杆菌生长的影响

结果见表 2。

2.2 不同浓度抑制剂在 pH7.0 的液体培养基中

从表 2 中数据可见,链霉素和头孢唑啉钠均

表2 抑制剂对地衣芽孢杆菌生长的影响

抑制剂浓度	地衣芽孢杆菌增长量(个/mL)			
	链霉素	青霉素	头孢唑啉钠	苯酚
0.0μg/mL(对照)	7.1×10 ⁷	7.1×10 ⁷	7.1×10 ⁷	7.1×10 ⁷
50μg/mL	1.1×10 ⁵	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁵	
70μg/mL	1.1×10 ³	1.1×10 ⁶	1.1×10 ⁴	
90μg/mL	1.1×10 ¹	1.1×10 ⁵	1.0×10 ⁴	
100μg/mL	1.1×10 ²	1.1×10 ⁴	1.0×10 ³	
150μg/mL	1.0×10 ²	1.1×10 ⁴	1.0×10 ⁴	
200μg/mL	0.6×10	1.1×10 ⁴	0.8×10 ³	
300μg/mL	0.2×10	1.1×10 ³	0.6×10 ²	
500μg/mL	0.1×10	1.1×10 ³	0.3×10	
1000μg/mL	0.0×10	0.9×10 ²	0.0×10	
2000μg/mL	0.0×10	0.2×10 ²	0.0×10	
3000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
4000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
5000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
6000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
7000μg/mL	0.0×10	0.0×10	0.0×10	
0.1%				1.1×10 ⁶
0.5%				1.1×10 ⁵
1.0%				1.1×10 ⁴
2.0%				1.1×10 ³
3.0%				1.1×10 ²
4.0%				0.8×10 ²

在 100μg/mL或者以上时,对地衣芽孢杆菌有抑制作用,没有增长。而青霉素在 2000μg/mL或以上时对该菌有抑制作用,增长为零。

—结果与固体平板抑制试验相一致。

2.3 不同抑制剂在不同 pH 条件下对地衣芽孢杆菌生长的影响

结果见表 3。

同样苯酚在 4% 以下对该菌无抑制作用。这

表3 抑制剂与pH对地衣芽孢杆菌生长的影响

含抑制剂的 液体培养基pH	地衣芽孢杆菌增长量			
	链霉素 100μg/mL	青霉素 2000μg/mL	头孢唑啉钠 1000μg/mL	苯酚(0.4%)
4.5	0.5×10	0.7×10	0.8×10	0.8×10 ⁷
5.0	0.5×10	0.7×10	0.8×10	0.8×10 ⁷
5.5	0.8×10	0.8×10	0.7×10	0.9×10 ²
6.0	0.8×10	0.9×10	0.7×10	0.9×10 ²
6.5	0.7×10	0.8×10	0.6×10	0.8×10 ²
7.0	0.0×10	0.0×10	0.0×10	0.7×10 ²
7.5	0.0×10	0.0×10	0.0×10	0.9×10 ²

从表 3 可看出,在 pH4.5~6.5 间,几种抑制剂

都有明显作用,说明 pH 不同时对抑制剂的作用有

一定影响,但它们之间区别幅度变化不很大。而在 7.5 以上会减弱抑制作用。这可能是由于几种抑制较高和较低 pH 条件下不太稳定的原故。而在 pH7.0 以下时,可能是由于该菌代谢产物中有一种偏碱的物质可使 pH 略有升高,此时如果培养基本身 pH 在 7.0 以下,抑制仍有作用。但如果培养基本身 pH 过高就会造成抑制剂作用减弱。

综上所述,青霉素和头孢唑啉钠几种抑制剂在 $1000\mu\text{g/mL}$ 和 $3000\mu\text{g/mL}$ 以上时对地衣芽孢杆菌抑制作用特别在适合的 pH 和其它条件

下对地衣芽孢杆菌有明显抑制作用。因此,这对该菌的生产和使用以及治疗机制方面的研究,如何抑制上述因素的影响提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 郝土海. 现代细菌学培养基和生河试剂手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1992, 121.
- [2] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986, 572.
- [3] Michael J, Pelczar Jr. Laboratory exercises in Microbiology, 1977, 243~247.