

# 抗生素类作为防腐剂对苏云金杆菌芽孢及伴胞晶体的影响\*

曹伟平<sup>1</sup> 冯书亮<sup>1</sup> 杨更亮<sup>2\*\*</sup> 范秀华<sup>1</sup> 王容燕<sup>1</sup>

(河北省农林科学院植物保护研究所 保定 071000)<sup>1</sup> (河北大学化学与环境科学学院 保定 071002)<sup>2</sup>

**摘要:**报道了14种抗生素作为防腐剂对苏云金杆菌CH菌株芽孢萌发的抑制作用和对伴胞晶体的影响。结果表明,红霉素、盐酸环丙沙星对CH菌株芽孢萌发有较强的抑制作用,在0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 低剂量下可抑制芽孢的萌发;氧氟沙星和麦迪霉素抑制作用稍差,在5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量下抑制作用随时间延长而减弱,96h后基本丧失抑制作用。其它几种抗生素对苏云金杆菌芽孢萌发的抑制终浓度均在30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上;SDS-PAGE分析和生物测定表明,红霉素、盐酸环丙沙、氧氟沙星和麦迪霉素对伴胞晶体均无明显损伤作用,其中氧氟沙星45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置4d,发酵液毒力保持率为96.2%。

**关键词:**苏云金杆菌,芽孢,伴胞晶体,抗生素

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0046-05

\* 国家自然科学基金资助项目 (No.30070516)

河北省自然科学基金资助项目 (No.399440)

Projection Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30070516)

\* \*\* 联系人 Tel: (0312) 5085763, E-mail: fshliang@heinfo.net

收稿日期: 2001-10-25, 修回日期: 2002-02-25

## EFFECT OF ANTIBIOTICS AS PRESERVATIVE ON *BACILLUS THURINGENSIS* SPORES AND PARASPORAL CRYSTALS

CAO Wei-Ping<sup>1</sup> FENG Shu-Liang<sup>1</sup> YANG Geng-Liang<sup>2</sup> FAN Xiu-Hua<sup>1</sup> WANG Rong-Yan<sup>1</sup>

(*Institute of Plant Protection, Hebei Agricultural & Forestry Science, Baoding 071000*)<sup>1</sup>

(*College of Chemical & Environmental Science, Hebei university, Baoding 071002*)<sup>2</sup>

**Abstract:** The paper reported the effect of fourteen kinds of antibiotics on spores and parasporal crystals of *Bacillus thuringensis* CH strain. In addition, their antiseptics was studied on basis of the results. The optimal antibiotics for controlling spore revegetation were nerythromycin and ciprofloxacin hydrochloride, both at 0.5 $\mu$ g/mL. Ofloxacin and ofloxacin needed higher doses, at 5 $\mu$ g/mL in liquid which could control spores growth in 96h. The others were above 30 $\mu$ g/mL to work. The spores treated with these antibiotics could bourgeon when the antibiotic was diluted or eliminated. SDS-PAGE and bioassay showed that Ofloxacin, erythromycin, ofloxacin and ciprofloxacin hydrochloride did not destroyed parasporal crystal, Ofloxacin had better preservation among the four antibiotics. After the fermented liquid added with ofloxacin was stored at 45 $^{\circ}$ C for four days, the percent original activity remaining was 96.2%.

**Key words:** *Bacillus thuringensis*, Spore, Parasporal crystal, Antibiotic

目前我国大多数厂家生产的苏云金杆菌制剂为悬浮剂。然而,在保存过程中悬浮剂的腐化及毒力的下降,一直是困扰悬浮剂稳定性的两大问题。当前,国内外生产的苏云金杆菌悬浮剂中,多采用二甲苯作为防腐剂防止其二次发酵及各种腐生微生物的繁殖<sup>[1]</sup>,但二甲苯易对环境造成污染。也有人采用山梨糖醇作为防腐剂<sup>[2]</sup>。另有文献报道,0.02%凯松CG+0.1%尼泊金甲酯<sup>[3]</sup>、5%甲醛+0.15%尼泊金<sup>[4]</sup>的防腐效果也较好,但此类防腐剂成本较高。

抗生素能钝化酶的活性,阻止微生物新陈代谢的某些环节,在低微浓度下对特异微生物的生长有抑制或杀灭作用。在Bt培养过程中加入某种特定的抗生素,可导致芽孢和伴胞晶体不能形成或只产生伴胞晶体而不形成芽孢<sup>[5]</sup>。作者认为在苏云金杆菌悬浮剂中加入适当的抗生素作为防腐剂,既可防止其二次发酵,又能够抑制某些杂菌的生长,从而可维持悬浮剂的稳定性。依据抗生素的特异性,本文考察了14种抗生素对苏云金杆菌CH菌株芽孢的抑制作用和对伴胞晶体的影响,并以抗生素类作为防腐剂进行了初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株:本研究室保存的CH菌株。

1.1.2 培养基:LB培养基(多肽蛋白胨10g,酵母浸出粉5g,NaCl 5g,葡萄糖1g,水1,000mg,pH7.2);LB琼脂培养基(琼脂20g,葡萄糖2g,NaCl 2g,牛肉膏10g,酵母粉10g,水1,000mg,pH7.2);摇瓶发酵培养基(豆饼粉45g,玉米淀粉15g,酵母粉15g,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3g,MgSO<sub>4</sub> 0.3g,MnSO<sub>4</sub> 0.05g,CaCO<sub>3</sub> 0.01g,水1,000mg,pH7.2)。

1.1.3 药剂:(1)链霉素(streptomycin,华北制药股份有限公司);(2)头孢唑啉钠(cefazolin sodium,石家庄制药集团有限公司);(3)青霉素(penicillin,华北制药股份有限公司);(4)氨苄西林钠(ampicillin sodium,石家庄制药集团有限公司);(5)呋喃妥

因 (nitrofurantoin, 天津市生力制药厂); (6) 复方新诺明 (compound sulfamethoxazole, 天津太平洋制药有限公司); (7) 土霉素 (oxytetracycline, 石家庄制药集团有限公司); (8) 麦迪霉素 (ofloxacin, 北京曙光药业有限责任公司); (9) 红霉素 (erythromycin, 华北制药股份有限公司); (10) 氧氟沙星 (ofloxacin, 昆山双鹤药业有限责任公司); (11) 盐酸环丙沙星 (ciprofloxacin hydrochloride, 江苏板桥药业有限责任公司); (12) 甲硝唑 (metronidazole, 石家庄康力制药厂); (13) 四环素 (tetracycline, 石家庄制药集团有限公司); (14) 诺氟沙星 (norfloxacin, 唐山市唐海制药厂), 以上药剂均为医用抗生素。抗生素配成原液后, 用细菌滤膜除菌, 储藏在  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 菌悬液及发酵液的调制与伴胞晶体的提纯:** 将 CH 菌株斜面接种到克氏瓶 LB 琼脂培养基斜面上,  $30^{\circ}\text{C}$  下培养 4d, 待胞晶游离后, 用少量无菌水将克氏瓶内的菌苔刮至无菌生理盐水中, 并将浓度调整为 2 亿芽孢/mL,  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。伴胞晶体的提纯参照文献[6]。

**发酵液调制:** 在 500mL 三角瓶中装入 30mL 摇瓶发酵培养基, 高压蒸汽灭菌, 接种 CH 菌株, 在  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  下进行摇床发酵, 至 20% ~ 40% 的胞晶游离为止, 用 1N HCl 调发酵液至 pH5 左右, 并测定初始毒力,  $4^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.2.2 抗生素对芽孢的处理方法:** 将一定量的抗生素分别加入到装有 4mL 灭菌 LB 培养基的试管中, 另以未加抗生素的灭菌 LB 培养基为对照。以试管内液体培养基的 1% (v/v) 比例接种 CH 菌悬液, 振荡摇匀, 恒温  $30^{\circ}\text{C}$  培养, 定期涂片检查芽孢的萌发情况; 对芽孢未萌发的培养液, 摇匀后移取 1mL 至平皿 ( $\phi$  6cm) 中, 涂敷均匀, LB 琼脂培养基恒温  $30^{\circ}\text{C}$  培养, 观察芽孢是否被抗生素杀死。

**1.2.3 抗生素对 CH 菌株伴胞晶体的处理方法:** 用万分之一电子天平称取一定量伴胞晶体悬浮于 1mL 无菌水中, 所加抗生素终浓度依 1.2.2 的试验结果作适当调整, 以未加抗生素的伴胞晶体作对照, 充分振荡后  $30^{\circ}\text{C}$  下放置, 期间振荡, 规定时间内将处理晶体转移至小离心管内, 用无菌水离心洗涤 ( $10^5$  r/min, 10min) 数次, 进行 SDS-PAGE 分析。

**1.2.4 抗生素的防腐防腐试验:** 将一定量的 CH 菌株发酵液装入塑料瓶中, 分别加入一定量的抗生素, 使其终浓度同 1.2.3 中各抗生素浓度,  $45^{\circ}\text{C}$  下加盖避光放置, 定期镜检杂菌生长情况, 观察发酵液气味变化, 并测定各处理发酵液的毒力。

**1.2.5 SDS-PAGE 方法:** 参照文献[7]样品处理方法。浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 8%, 电极缓冲液采用 Tris-甘氨酸系统。浓缩胶部分的电压为 120V, 样品进入分离胶后电压升高到 150V, 考马斯亮蓝染色。

**1.2.6 生物测定:** 以经验致死中浓度为参照, 将各处理发酵液以 1.8 倍等比级差稀释成不同浓度菌悬液, 蘸泡无毒棉叶, 晾干。以 1 龄末棉铃虫幼虫为供试昆虫, 采用感染饲喂法, 每个处理重复 3 次, 每个重复接虫 30 头, 另设清水对照, 置  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养, 处理后 4d 检查死、活虫数, 计算  $\text{LC}_{50}$ 。

## 2 结果

### 2.1 抗生素对芽孢的抑制作用

通过 14 种抗生素对 CH 菌株芽孢萌发抑制浓度的测定表明, 不同抗生素之间有很

大差异,从 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  ~ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$  不等,同种浓度下不同抗生素抑制芽孢萌发有效期也有所不同。本研究重点考察了所列抗生素在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的剂量下对芽孢萌发的抑制效果(见表1)。由表1可以看出,麦迪霉素,红霉素,氧氟沙星,盐酸环丙沙星对芽孢萌发的抑制作用较强, LB 培养基中,在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的剂量下 96h 内均可抑制芽孢的萌发;链霉素在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的剂量下 72h 内可抑制芽孢的萌发;甲硝唑在 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的剂量下 72h 内可抑制芽孢的萌发;其它几种抗生素在 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的剂量下 96h 内均不能抑制芽孢的萌发。LB 琼脂培养基培养试验表明,经 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  红霉素和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  盐酸环丙沙星处理的芽孢 30 $^{\circ}\text{C}$  恒温放置一个月后,芽孢仍未萌发,而经 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的麦迪霉素和氧氟沙星处理的芽孢在一个月內可萌发。抗生素经 LB 琼脂培养基稀释后, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  红霉素和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  盐酸环丙沙星的浓度约为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 说明红霉素和盐酸环丙沙星在低剂量下对 CH 菌株芽孢就有很强的抑制作用,且作用时间较长。

表1 14种抗生素低微浓度下对 Bt CH 菌株芽孢的抑制情况

药剂		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	CK
5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *	24h	-**	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	48h	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	72h	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	96h	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ *	24h	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	48h	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	72h	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	96h	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+

\* 试管内药剂浓度, \*\* 平皿内 CH 菌株培养情况, + 芽孢萌发, - 芽孢未萌发

为明确红霉素和盐酸环丙沙星是否将苏云金杆菌芽孢杀死,在盛有无菌水的试管中,以水量的 1% (v/v) 比例加入 CH 菌悬液,并加入一定剂量的红霉素和盐酸环丙沙星,使红霉素和盐酸环丙沙星的终浓度均为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 30 $^{\circ}\text{C}$  恒温放置 2d 后,移取菌液 1mL 至小离心管内,用无菌水洗涤离心 (105r/min, 10min) 数次,除去其中的抗生素,加入 1mL 无菌水,振荡 3mins,使芽孢充分悬浮,移至平皿 ( $\phi$  6cm) 中,涂敷均匀,在 LB 琼脂培养基中恒温 30 $^{\circ}\text{C}$  培养,观察芽孢是否萌发。24h 后,芽孢均萌发,说明在液剂中 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  红霉素和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  盐酸环丙沙星均未杀死 CH 菌株芽孢;涂片相差显微镜观察,芽孢经各种抗生素处理后,萌发产生的芽孢及晶体的形状未发生改变、芽孢与晶体的数量相当,说明试验浓度下,抗生素未使 CH 菌株发生变异。

### 2.2 抗生素对伴胞晶体的作用

试验考察了对芽孢萌发抑制作用较强的麦迪霉素,红霉素,氧氟沙星,盐酸环丙沙星对 CH 菌株伴胞晶体的作用, SDS-PAGE 检测结果(见图1)表明,试验浓度下,这4种抗生素对 CH 菌株伴胞晶体无损伤作用。

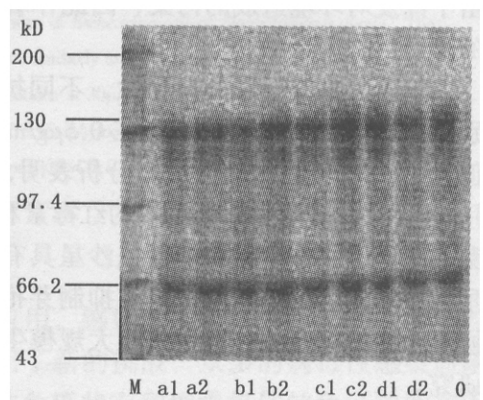


图1 1.2.3 中经不同抗生素不同浓度处理的伴胞晶体的 SDS-PAGE 图谱

M 次高分子量标准蛋白, a1 8-20, a2 8-100, b1 9-5, b2 9-25, c1 10-20, c2 10-100, d1 11-5, d2 11-25, 0 清水 CK, “-”前数字为抗生素编号, “-”后数字为抗生素剂量 (单位:  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

### 2.3 抗生素的防霉防腐能力

在初步研究了各抗生素对 CH 菌株芽孢及伴胞晶体的影响的基础上,考察了麦迪霉素,红霉素,氧氟沙星,盐酸环丙沙星对 CH 菌株发酵液的防腐效果,结果表明,在 45℃ 条件下放置,4d 后镜检,除发酵液空白对照外,添加抗生素的发酵液均未污染杂菌;8d 后,添加麦迪霉素、红霉素的发酵液及未加抗生素的空白对照表面出现霉菌,镜检污染较多杂菌,发酵液空白对照有异味。经氧氟沙星和盐酸环丙沙星处理的发酵液表现正常,镜检未见杂菌污染。

### 2.4 以抗生素为防腐剂的 Bt 发酵液毒力稳定性测定

试验考察了添加抗生素的 CH 菌株发酵液在 45℃ 条件下放置的毒力变化情况,生物测定结果(见表 2)表明,以 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量的氧氟沙星为防腐剂的发酵液毒力稳定性较好,45℃ 下放置 4d 发酵液毒力保持率为 96.2%;5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量的红霉素保持发酵液毒力的稳定性次之,同样条件下,发酵液毒力保持率为 89.1%;另外几种浓度和抗生素保持发酵液毒力在 59.4%~85.3% 之间,发酵液空白对照毒力保持率仅为 42.9%。从麦迪霉素、红霉素、氧氟沙星和盐酸环丙沙星保持发酵液毒力稳定性的效果看,以抗生素作为防腐剂,一般情况下,抗生素剂量越高,防腐效果越好,但也有特殊情况。

表 2 以抗生素为防腐剂的 Bt CH 菌株发酵液毒力稳定性测定

处理	8-20*	8-100	9-5	9-25	10-20	10-100	11-5	11-25	发酵液 CK	初始发酵液
LC <sub>50</sub> ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	22.9	18.8	15.6	20.2	16.3	14.4	23.4	20.4	32.2	13.9
毒力保持率/%	60.7	73.7	89.1	68.9	85.3	96.2	59.4	68.1	42.9	

\* “-”前数字为抗生素编号,“-”后数字为抗生素剂量(单位: $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

## 3 讨论

以常用抗生素类作为防腐剂,从成本上分析,较山梨糖醇、尼泊金等防腐剂经济;从稳定性和环保方面分析,抗生素类不易挥发,且不存在类似二甲苯、甲醛等防腐剂由于挥发对环境造成的污染,因此作者认为某些抗生素类物质作为苏云金杆菌悬浮剂的防腐剂是可行的。

抗生素具有一定的特异性,不同抗生素对 CH 菌株芽孢萌发的抑制浓度有较大差别,红霉素和盐酸环丙沙星在 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  剂量下均可在一个月內抑制 CH 芽孢的萌发,但并未杀死芽孢;SDS-PAGE 分析表明,试验浓度下各抗生素对伴胞晶体无明显损伤作用。在 Bt 发酵液中添加适量的红霉素和盐酸环丙沙星,可有效防止其二次发酵。对 Bt 芽孢萌发抑制作用较弱的氧氟沙星具有较好的防霉防腐能力;氧氟沙星和盐酸环丙沙星均属喹啉类抗菌物质,但其抑制芽孢萌发和防腐效果有所不同。不同抗生素之间的协同防腐作用及各种抗生素在大规模生产中作为防腐剂的使用剂量范围还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] Sminoff W A, Vaero J R. *J Invertebr Pathol*, 1983, 42: 415~417.
- [2] 喻子牛. 苏云金杆菌(第一版). 北京: 科学出版社, 1990. 293.
- [3] 马立安. 微生物学杂志, 2000, 20(3): 37~39.
- [4] 张俊亭, 李治祥, 张克强, 等. 农业环境保护, 1998, 17(4): 158~161.
- [5] Yousten A A, Rogoff M H. *J Bacteriol*, 1969, 100: 1229~1236.

2002年29(6)

微生物学通报

• 51 •

[6] 王文军, 钱传范, 申继忠, 等. 微生物学报, 1999, 39(5): 469~474.

[7] 刘丰茂, 钱传范, 江树人. 植物保护学报, 1998, 25(4): 359~363.