

三株螺原体对抗生素敏感性的体外测定

郭永红 陈永萱

(南京农业大学植保系)

摘要 对我国新分离的两个螺原体和典型的柑桔僵化病螺原体,在体外条件下对 10 种抗生素的敏感性进行了测定;其敏感程度用最小生长抑制浓度 (MIC) 和最小致死浓度 (MBC) 表示。结果表明,红霉素、四环素、土霉素等有较强的生长抑制和致死作用;其次是氯霉素、夹竹桃霉素、庆大霉素;作用较弱的有链霉素、新霉素、卡那霉素;青霉素在试验浓度范围内 (0.01—2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 无作用。三株供试菌中,以柑桔僵化病螺原体 (Sc189) 对 10 种抗生素最敏感,新分离的两个螺原体 CH-1 和 CB-2 的敏感性相似。同时,不同培养时间对 MIC 测定值有影响,其影响程度随菌株及抗生素的不同而有差异。

关键词 螺原体;抗生素敏感性

在植物菌原体(支原体)中,有一种螺原体 (*Spiroplasma*) 在离体条件下能培养。它可引起柑桔僵化病 (citrus stubborn) 和玉米矮化病 (corn stunt) 等植物病害^[1]。该菌原体(支原体)具有独特的形态和运动性,也具有与类菌原体 (Mycoplasma-like Organism, MLO) 相似的对抗生素敏感的特性(如四环素类)^[2]。另外还有一些螺原体,可引起节肢动物(主要是昆虫)病害。这些引起植物及昆虫病害的螺原体对抗生素的敏感性是有差别的。有人利用它们对抗生素敏感性的差异,对螺原体进行分类鉴定^[3]。因此,体外测定螺原体对不同抗生素敏感性的差异,在利用抗生素治疗植物和昆虫螺原体病害和对螺原体本身特性的研究上均具有重要意义。

材料和方法

(一) 菌株

蜜蜂螺原体 CH-1 和大叶黄杨螺原体 CB-2 在国内分别从蜜蜂和大叶黄杨上分离到^[4]; 柑桔螺原体 (*Spiroplasma citri*) Sc 189 和 ATCC 27665, 由美国 Rutgers 大学 Dr. T. A. Chen 惠赠。

(二) 培养基

供试菌株培养在由 C-3G 培养基^[5]稍加改良后的 R-2 培养基中。R-2 培养基含有 1.5% (W/V) 牛心浸出液干粉、10% (W/V) 蔗糖、15% (V/V) 马血清和 0.001% (W/V) 酚红; pH 调至 7.2—7.4。

(三) 抗生素及药敏试验

国产医用四环素、氯霉素、土霉素、红霉素、卡那霉素、链霉素、庆大霉素、青霉素和 Sigma 公司生产的夹竹桃霉素及新霉素等 10 种抗生素,经孔径 0.22 μm 的微孔滤膜过滤灭菌后,分别用 R-2 培养基稀释成 0.01—2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 共 17 个不同浓度。

分别取含不同浓度抗生素的 R-2 培养基 2ml 于试管中,接种生长 36—48 小时的螺原体菌液 5 μl (浓度约为 6—8 $\times 10^8$ 个菌/ml); 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 天,记录各试管培养基的颜色变化,并用暗视野显微镜检查有无螺原体增殖。将不能改变培养基颜色(即无螺原体增殖)的抗生素最低浓度定为生长抑制最低浓度 (MIC)。

从无色变化的试管内,分别取出 50 μl 已接种螺原体的含抗生素培养基,移植到 2ml 不含抗生素的 R-2 培养基中; 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 周,观察培养基颜色变化; 将能改变培养基颜色的最高抗生素浓度定为螺原体最低致死浓度

(MBC)。

以在不加抗生素的 R-2 培养基中培养的螺原体作为对照；每个抗生素浓度接种 2—3 管；药敏试验重复二次。

结果和讨论

(一) 三株螺原体的 MIC 和 MBC 值测定结果

表 1 三株螺原体的 MIC 和 MBC 值测定结果

菌株 抗生素	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			MBC ($\mu\text{g/ml}$)		
	CH-1	CB-2	Sc189	CH-1	CB-2	Sc189
红霉素	0.04	0.08	0.01	10	2.50	0.02
四环素	0.625	0.08	0.04	2.50	10	0.625
土霉素	2.50	1.25	0.31	100	100	1.25
夹竹桃霉素	1.25	0.625	0.08	100	100	1.25
庆大霉素	10	5	0.08	50	100	0.625
氯霉素	1.25	1.25	0.31	100	100	5
卡那霉素	50	50	0.625	100	250	5
链霉素	50	50	1.25	100	250	5
新霉素	50	50	1.25	100	250	10
青霉素	>2000	>2000	>2000	—	—	—

10 种抗生素对螺原体 CH-1、CB-2 和 Sc189 三个菌株的 MIC 和 MBC 值测定结果见表 1。

表 1 结果说明，在 10 种抗生素中，四环素、土霉素、红霉素和夹竹桃霉素对三株螺原体有较强的敏感作用，其中红霉素作用最强，对 CH-1、CB-2 和 Sc189 的 MIC 值分别是 0.04、0.08 和 0.01 $\mu\text{g/ml}$ ；其次是氯霉素和庆大霉素，但对 Sc189，庆大霉素的作用比土霉素强，氯霉素与土霉素作用相似；卡那霉素、链霉素和新霉素的作用较弱，对 CH-1 和 CB-2 的 MIC 值均为 50 $\mu\text{g/ml}$ ，MBC 值均为 100 $\mu\text{g/ml}$ ，而对 Sc189 的 MIC 值分别为 1.25、0.625 和 1.25 $\mu\text{g/ml}$ ，MBC 值分别为 5、5 和 10 $\mu\text{g/ml}$ ；青霉素在试验浓度范围内 (0.01~2000 $\mu\text{g/ml}$) 对三株螺原体的生长都没有抑制作用。

(二) 三株螺原体的药敏试验

螺原体 CH-1、CB-2 和 Sc189 对抗生素的敏感性以 Sc189 最敏感，其 MIC 和 MBC 值均比 CH-1 和 CB-2 小；CH-1 和 CB-2 的敏感性相似。

不同抗生素对同一菌株的 MIC 值与 MBC 值的值差不同，如螺原体 Sc189，红霉素的 MIC 值 (0.01 $\mu\text{g/ml}$) 与 MBC 值 (0.02 $\mu\text{g/ml}$) 相

表 2 不同培养时间下的 MIC 值 ($\mu\text{g/ml}$)

菌株 培养 时间 (天)	CH-1			CB-2			Sc189		
	2	5	10	2	5	10	2	5	10
红霉素	0.04	0.15	0.31	0.08	0.15	0.15	0.01	0.01	0.01
四环素	0.625	2.50	2.50	0.625	2.50	2.50	0.04	0.08	0.08
土霉素	2.50	50	50	1.25	2.50	5	0.31	0.31	0.31
夹竹桃霉素	1.25	50	50	0.625	5	50	0.08	0.15	0.15
庆大霉素	10	10	50	5	10	10	0.08	0.15	0.31
氯霉素	1.25	5	5	1.25	2.50	10	0.31	0.625	0.625
卡那霉素	50	50	100	50	50	50	0.625	0.625	1.25
链霉素	50	50	50	50	50	50	1.25	2.50	2.50
新霉素	50	50	50	50	50	50	1.25	1.25	1.25

差 2 倍,而夹竹桃霉素的 MIC 值 ($0.08\mu\text{g}/\text{ml}$) 与 MBC 值 ($1.25\mu\text{g}/\text{ml}$) 则相差近 20 倍;同一抗生素对不同菌株的 MIC 值与 MBC 值的值差也不同,如夹竹桃霉素对 CB-2 的 MIC 值 ($0.625\mu\text{g}/\text{ml}$) 与 MBC 值 ($100\mu\text{g}/\text{ml}$) 相差 160 倍以上;红霉素对 CH-1 相差达 250 倍。这反应了抗生素在抑制螺原体生长或致死能力的差异,而这种差异是随抗生素种类及螺原体菌株的不同而变化的。

(三) 不同培养时间对三株螺原体的 MIC 值影响

试验中发现,不同培养时间对三株螺原体的 MIC 值有一定影响,其影响大小随抗生素和螺原体的不同而异(表 2)。

从表 2 结果可以看出,在不同培养时间内,9 种抗生素对三株螺原体的 MIC 值有不同影响,其中 Sc189 的 MIC 值变化最小。夹竹桃霉素对 CB-2 的 MIC 值变化最大,培养 2 天与 10 天的 MIC 值相差 80 倍。这一现象说明在测定 MIC 值时,培养时间是一个不可忽视的因素。Bowyer 等也曾发现接种量及培养时间对 MIC 和 MBC 值有影响^[6],并认为其原因是多方面的综合因素,如抗生素在含血清的碱性培养基中变性,抗生素的静菌效应(static effect)等。但是,也不能排除螺原体本身的适应性及其产生抗性个体的可能性,如 Liao 等曾利用在含抗生素的培养基中连续培养螺原体而筛选出抗性菌株^[7]。螺原体对抗生素产生抗性的现象,在植物和昆虫螺原体病害的治疗中应引起注意。

本文研究结果表明,青霉素在测定浓度范

围内对三株螺原体无任何抑制生长和致死作用,这是因为青霉素的作用是抑制细菌细胞壁的合成,而螺原体则是一类无细胞壁的原核生物。实验中其它 9 种抗生素的作用是抑制细胞蛋白或核酸的合成,因而对三株螺原体的生长有不同程度的抑制作用。其中以红霉素、四环素等作用较强,而卡那霉素、链霉素和新霉素对三个菌株的作用较弱,其它人也有类似的结果^[1,6,7];但 Liao 等的研究表明链霉素对 *S. citri* 作用弱,而卡那霉素则高度有效^[7]。这可能是由于试验方法及药品来源不同所致。

本文所得出的抗生素对螺原体的 MIC 值和 MBC 值,因受试验技术、培养基的组份及性质等因素的影响,不是固定不变的;这与 Bowyer 等所得结果一致^[6]。MIC 值和 MBC 值反应出不同菌株对各种抗生素的相对敏感性,为治疗植物螺原体和蜜蜂螺原体病害进行抗生素的筛选,提供了科学依据。

参 考 文 献

- [1] Bove, J. M.: *Ann. Rev. Phytopathology*, **22**: 361—396, 1984.
- [2] Igwebge, E. C. K. et al.: *Phytopathology*, **63**: 1044—1048, 1973.
- [3] Davis, R. E.: *App. Envir. Microbiol.*, **41**: 329—333, 1981.
- [4] Chen, Y. X. et al.: *Scientia Sinica (series B)*, **XXXI**: 1073—1079, 1988.
- [5] Liao, C. H. et al.: *Phytopathology*, **67**: 802—807, 1977.
- [6] Bowyer, J. W. et al.: *Phytopathology*, **64**: 346—349, 1973.
- [7] Liao, C. H. et al.: *Phytopathology*, **71**: 442—445, 1981.
- [8] Ishiie, T. et al.: *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.*, **33**: 267—275, 1967.