

硫酸盐还原菌耐药性研究

刘宏芳 董泽华 范汉香 许立铭

(华中理工大学化学系 武汉 430074)

摘要 硫酸盐还原菌(简称SRB)对杀菌剂十二烷基二甲基苄基氯化铵(简称“1227”)的耐药性是由药物诱导产生,这种由适应所产生的耐药性获得快而且是可逆的,随着时间的推移抗药性减弱,6个月后抗药性逐渐消失。研究还表明SRB对甲硝唑没有明显的交叉耐药性。

关键词 SRB、耐药性、杀菌剂

SRB是土壤中常见的厌氧腐蚀菌,是腐蚀石油集输管线的主要菌种。为了减少腐蚀损失,油田污水在回注地层时,都必须投加一定量的杀菌剂,但长期使用一种杀菌剂,就出现细菌抗药性问题,我国油田普遍使用1227杀菌剂,以抑制SRB细菌的生长,但使用一段时间后,杀菌浓度从原来的20~30mg/l提高到100mg/l以上才能杀死细菌。自从50年代初期,日本学者发现多重耐药性痢疾杆菌以来,世界上许多国家和地区进行了细菌耐药性的调查和监测,一些研究者纷纷报道了各种细菌对常用抗生剂的耐药谱和耐药率,及其随时间而变化的关系^[1~4],但对SRB的耐药性的研究很少有报道。本文对SRB对1227产生抗药性以及耐药性是否稳定进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 实验菌株

新疆克拉玛依油田提供的SRB菌种,经鉴定为普通脱硫弧菌(*Desulfovibrio vulgaris*)。

1.2 培养基

采用APIRP-38^[5]所推荐的培养基,组成如下:

乳酸钠 4.0ml, 酵母浸汁液 1.0g, 维生素C 0.1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, K_2HPO_4 0.01g, NaCl 10.0g, 蒸馏水 1000.0ml, pH7.0~7.2 于 1.2×10^4 pa 蒸气压下灭菌 10min, 然后加入经紫外灭菌的 $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2 \cdot 6H_2O$ 0.2g。

1.3 耐药菌的获得

将SRB菌接种于上述培养基中进行两次活化,然后测定它们在此培养基中的生长曲线,并测定“1227”的最低杀菌浓度。在对数生长期的中期,吸取10ml菌液置于100ml含“1227”浓度为70mg/l的培养基中,置于37℃恒温箱中,培养2d至变黑(说明细菌呈阳性)。取这种变黑的细菌再接种于含100mg/l的“1227”的培养基中,37℃下恒温培养2d至变黑,如此不断增大,“1227”的浓度到最低杀菌浓度,由此获得了抗“1227”的菌株。

1.4 稳定性试验

细菌的耐药性主要由适应和突变两种方式形成,并可借转导结合,转化等途径由耐药菌将耐药性转授给敏感菌^[6]。研究证明,诱导性抗药性产生快,有特异性,可以遗传并且是可逆的^[1],为了验证“1227”的耐药性是由适应产生的,还是由突变形成的,作了如下两种稳定性试验:(1)将抗药菌接种于不含“1227”的培养基中,连续接种培养3~5次,然后再用的“1227”进行杀菌试验,看其最低杀菌浓度是否发生变化,由此推知其抗药性是否稳定;(2)将抗药菌置于4℃的低温中保藏3~6个月,然后活化培养测其最低杀菌浓度,看其最低杀菌浓度是否发生变化,由此可推知其抗药性随时间变化的关系。

1.5 抗药菌的交叉耐药试验

采用抗药菌与初始菌种进行对比杀菌试验,测其最低杀菌浓度,比较其最低杀菌浓度是否相近,由此可推知抗药菌是否有交叉耐药性,选用的杀菌剂为甲硝唑。

2 结果与讨论

2.1 SRB生长曲线的测定

取一定量的细菌活化培养,测量菌量随时间变化的关系。结果见图1。

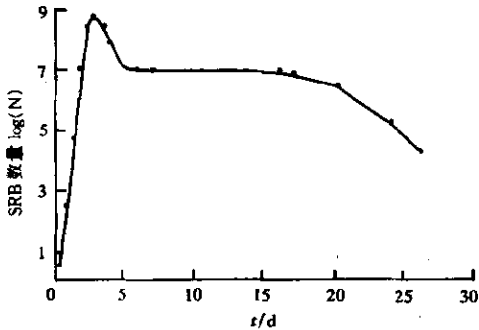


图1 SRB生长曲线

2.2 “1227”最低杀菌浓度的测定

采用四管平行法测其最低杀菌浓度,SRB的初始菌量为 4.5×10^4 个/ml,杀菌时间为1h。结果表明“1227”对此SRB的最低杀菌浓度为150mg/l。

2.3 抗药菌的最低杀菌浓度的测定

通过连续几代与低于最低杀菌浓度的“1227”药剂接触,获得抗药菌。采用四管平行法测其最低杀菌浓度,其结果如表1。

从表1可以看出由此培养出的抗药菌其最低杀菌浓度为700mg/l,与2.1中的结果相比增大了5倍左右。

2.4 稳定性试验

抗药菌的抗药性的获得是由适应获得,还是由突变获得作了如下两种试验:(1)将上述的抗药菌接种于不含“1227”的培养基中,连续接种培养5次后,取此活性菌液进行杀菌试验(表2)。由表2可以看出,此抗药菌通过5次活化培养后,其最低杀菌浓度在150mg/l左右,与2.1中的实验结果很相近,这说明此抗药性是可逆的,不稳定,获得快,消失亦很快;(2)为了测定

表1 “1227”对抗药菌的杀菌试验

浓度(mg/l)	200	300	400	500	600	700 ●	800
1d	++++	++++	----	----	----	----	----
2d	++++	++++	++++	++++	----	----	----
10d	++++	++++	++++	++++	+-	----	----

注:初始菌量为 3.0×10^3 个/ml,杀菌时间为1h

表2 “1227”对通过5代培养的抗药菌的杀菌试验

浓度(mg/l)	80	100	120	150	200
1d	++++	+++	----	----	----
2d	++++	++++	+-	----	----
10d	++++	++++	++++	----	----

注:初始菌量为 4.5×10^4 个/ml,杀菌时间为1h。

表3 “1227”对冷藏的抗药菌的杀菌试验

浓度(mg/l)	80	100	120	150	200
1d	++++	+++	----	----	----
2d	++++	++++	++++	----	----
10d	++++	++++	++++	----	----

注:初始菌量为 3.0×10^4 个/ml,杀菌时间为1h。

抗药菌的抗药性随时间变化的关系,将此抗药菌在低温中保藏4个月后,再将此抗药菌活化进行杀菌试验(表3)。由表3可以看出,此抗药菌经过冷藏后再活化其最低杀菌浓度为150mg/l,与2.1中的实验结果相同,此抗药菌的抗药性随时间的延长而消失。从稳定性试验来看,两种稳定性试验获得的细菌耐药性都是随时间的变化而逐渐减弱,直至消失。SRB对“1227”的抗药性是由药物诱导所获得,这种抗药性获得快,而且消失亦很快。原因是药物作为一种诱导剂,使细菌处于抑制状态的耐药性基因解除抑制而得以表达,这种机理可用雅各布—磨诺德(Jacob - Monod)的学说来解释^[1]。

2.5 交叉耐药试验

甲硝唑是一种不同于“1227”的非离子型杂环类杀菌剂,为了验证SRB对甲硝唑是否具有交叉耐药性,以甲硝唑对耐药SRB菌和原始SRB菌种进行杀菌试验,耐药菌的初始菌量为 3.0×10^4 个/ml原始菌为 4.5×10^4 个/ml。结果表明,甲硝唑对两种菌种的最低杀菌浓度均为5mg/l,两者未见明显的差别,说明该耐药菌对甲硝唑没有交叉耐药现象,因此采用间隔一段时间更换一种杀菌剂,可能会防止抗药菌

的产生。

3 结论

SRB对“1227”的耐药性产生快,消失也快,此耐药性的获得是由于药物诱导所致;而对“1227”具有耐药性的SRB对甲硝唑没有交叉耐药性,此外对“1227”具有耐药性的SRB菌,其抗药性不稳定,随着时间的延长而逐渐减弱至消失。

参 考 文 献

- [1] 薛广波主编. 实用消毒学. 第一版,北京:人民军医出版社,1986.
- [2] 薛广波,张永生,黄月仙等. 第二军医大学学报,1982,3(3):234~236.
- [3] 薛广波,程良芳,张子福等. 第二军医大学学报,1982,3(4):328~330.
- [4] 陈锦英. 中华内科杂志,1982,2(8):455~458.
- [5] Booth G H, Eford L, Wakerley D, S. Microbiological Battery Induced by Sulphate - Reducing Bacteria. Brit. Corrosion J. 1988, 23(3): 242~243.
- [6] 上海第一医学院华山医院编. 临床抗菌药物手册. 上海:上海人民出版社,1977.

STUDIES ON THE DRUG-RESISTANCE OF SULFATE REDUCING BACTERIA

Liu Hongfang Dong Zehua Fan Hanxiang Xu Liming

(Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074)

Abstract The drug - resistance of Sulfate Reducing Bacteria (SRB) to the “1227” bactericide (ducecyldimethyl - benzyl ammonium chloride) is induced by drug. The results obtained showed that the drug - resistance caused by adaptation of SRB produced fast and reversibly. With the time pass by the drug - resistance decreased gradually and disappeared in six months.

Key words SRB, Drug - resistance, Bactericide