



# 球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus*) 对抗生素的抗性

袁志明 刘娥英 张用梅 蔡昌建 陈宗胜

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

**摘要** 考查了 27 株球形芽孢杆菌有毒株对青霉素、链霉素、四环素、氯霉素、红霉素、卡那霉素、庆大霉素、麦迪霉素、核糖霉素、利福平、吡啶黄、磺胺和迭氮钠的自然抗性。结果表明, 所有菌株对高浓度的链霉素和迭氮钠及低浓度的氯霉素有抗性, 大部分菌株对四环素有抗性。所有菌株对所考查的其它几种抗生素敏感。

**关键词** 球形芽孢杆菌; 抗生素

球形芽孢杆菌 (*Bacillus sphaericus* Neide, 简称 B. s) 是一种在自然界中广泛分布的好气芽孢杆菌, 同梭形芽孢杆菌 (*B. fusiformis*)、巴氏芽孢杆菌 (*B. pasteurii*)、洛氏芽孢杆菌 (*B. loehnisii*) 和旋转芽孢杆菌 (*B. rotans*) 相似。B. s 芽孢球形, 孢子囊末端明显膨大。现已证明在 44 个血清型中, 有 7 个血清型 B. s 菌株对蚊幼虫有一定的毒杀作用, 有些菌株如 2362、2297、1593 和 C<sub>3</sub>-41 等菌株对库蚊 (*Culex*)、按蚊 (*Anopheles*) 幼虫有很高的毒性, 对伊蚊 (*Aedes*) 幼虫也有病原性<sup>[1,2]</sup>。B. s 只对蚊幼虫有特异性毒杀作用, 而对其它动、植物无毒无害, 是一种很有开发前景的蚊虫病原菌。对该菌的分类、遗传、生理、生化和病理等方面已进行了研究<sup>[3]</sup>。利用这种蚊虫病原菌开发出了高效杀蚊幼制剂, 在蚊虫的微生物防治中取得了良好的防治效果<sup>[4-6]</sup>。

*B. sphaericus* 有毒株对库蚊幼虫毒性很强, 而且在环境中持效期长, 并有可能在环境中再循环, 但是它对伊蚊幼虫的毒性低于另一种对蚊幼虫有高毒性的芽孢杆菌——苏云金杆菌以色列亚种 (*B. thuringiensis* subsp. *israelensis*)。后者对伊蚊毒性最强, 但对库蚊的毒性又不如 B. s 菌株, 而且在环境中持效期短<sup>[7-9]</sup>。作者试图利用细胞融合和质粒 DNA 转化技术进行 B. s 菌株的改良, 以获得高效广谱杀蚊菌株。为了选择适合融合子和转化子筛选的选择性标记, 我们考查了 27 株 B. s 有毒菌株对抗

生素的抗性, 确定了链霉素、四环素和氯霉素对不同 B. s 菌株的最低抑制浓度, 并测定了这些抗性特征的稳定性。

## 材料和方法

### (一) 菌株

本实验所用菌株及来源列于表 1。

### (二) 培养基

PBMY 培养基: 蛋白胨 1%, 酵母膏 0.3%, 牛肉膏 0.5%, MgSO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.02%, pH 7.0—7.2, 固体培养基中加 2% 琼脂。

### (三) 抗生素

链霉素和红霉素 (Calbiochem®); 氯霉素、四环素、卡那霉素、庆大霉素、利福平、麦迪霉素、核糖霉素、氨卞青霉素和磺胺为医用抗生素; 吡啶黄 (Sigma®)、迭氮钠 (分析纯)。抗生素配成原液后, 用细菌滤膜除菌, 然后按所需量加入培养基中或贮藏在 -20℃ 冰箱中。

### (四) 方法

1. 抗性测定: 将冰箱保存的斜面菌种活化一代后点接在 PBMY 固体平板上, 30℃ 培养 12 小时, 再分别影印在含氯霉素 (12.5 μg/ml)、氨卞青霉素 (15 μg/ml)、四环素 (15 μg/ml)、红霉素 (20 μg/ml)、链霉素 (50 μg/ml)、卡那霉素 (20 μg/ml)、庆大霉素 (20 μg/ml)、利福平 (20 μg/ml)、麦迪霉素 (20 μg/ml)、核糖霉素 (20 μg/ml)、磺胺 (20 μg/ml)、吡啶黄 (25 μg/ml) 和迭氮钠 (100 μg/ml) 的 PBMY 平板上,

表1 球形芽孢杆菌菌株及来源

菌株	DNA 同源型	血清型	噬菌体型	来源
KQ	IIA	H1a	1	美国 Spizizen
SSII-1,1404 1883,1885,1886 1888,1890,1892	IIA	H2	2	美国 Spizizen
1894	IIA	H2	5	美国 Spizizen
1593,2362,1691 2117-2,2013-6 1881	IIA	H5	3	美国 Spizizen
C <sub>3</sub> -41 BS-10	IIA	H5	ND*	本室分离保藏 江苏里下河地区农科所分离
2297,2297-2 2297-7,2173 2314-2,2317-3	IIA	H25	4	美国 Spizizen
2115	IIA	?	5	美国 Spizizen
2118	IIA	?	6	美国 Spizizen
2315	IIA	H26	7	美国 Spizizen

\* ND 未确定

30℃ 培养 24 小时, 观察不同菌株的生长情况。

2. 抗生素最低抑制浓度的确定: 活化一代的斜面菌株点接在 PBMV 平板上, 30℃ 培养 12 小时后, 分别影印在含不同浓度的链霉素、四环素和氯霉素的 PBMV 平板上, 30℃ 培养 24 小时, 观察其生长情况。能抑制不同 *B. s* 菌株生长的最低抗生素浓度即为该抗生素对某一菌株的最低抑制浓度。

## 结 果

### (一) 抗性测定(表 2)

从表 2 结果可以看出, *B. s* 对所测定的大部分抗生素敏感, 如氨卞青霉素、卡那霉素、庆大霉素的剂量在 20 $\mu$ g/ml 就可以完全抑制其生长。甚至在剂量低到 4 $\mu$ g/ml 时, 也能抑制所有菌株生长。但是 *B. s* 对链霉素和迭氮钠却有较强的抗性, 所考查的有毒株 7 个血清型和 7 个噬菌体型的所有菌株对这两种抗生素都有抗性。2115 和 2315 菌株除外, 所有 *B. s* 菌株在含 15 $\mu$ g/ml 四环素的 PBMV 培养基上不能生长, 但是在所含浓度低于 15 $\mu$ g/ml 四环素

的培养基上能生长。*B. s* 的不同血清型或同一血清型的不同菌株对氯霉素的抗性剂量都不一样。

### (二) 抗生素最低抑制浓度的确定

有文献报道 *B. s* 1593 菌株可以抗 10 $\mu$ g/ml 和 100 $\mu$ g/ml 的链霉素<sup>[7,10]</sup>。Burke<sup>[10]</sup> 也研究了 *B. s* 不同血清型的有毒株和无毒株对链霉素和氯霉素的抗性, 结果表明, 所有 *B. s* 菌株可以抗剂量在 4mg/ml 以上的链霉素; 除 ATCC 14577 菌株外, 所考查的其它菌株都能抗 6 $\mu$ g/ml 的氯霉素。这与本文的结果相似。除 SSII-1、2173 和 1691 菌株受链霉素抑制的最低浓度为 4.48mg/ml 以外, 其它菌株受其抑制的最低浓度均在 7.46mg/ml 以上, 最高可达 18.7mg/ml。除 KQ 和 2013-6 菌株外, 其余菌株对四环素均有一定的抗性, 四环素的最低抑制浓度在 5 $\mu$ g/ml 以上。2315 菌株对氯霉素敏感, 其余菌株对氯霉素都有抗性, 氯霉素对不同菌株的最低抑制浓度在 6.2 $\mu$ g/ml 以上, 而对 1691, 2314-2 菌株的最低抑制浓度在 25 $\mu$ g/ml 以上。

### (三) 抗性特征的稳定性

表2 球形芽孢杆菌对抗生素抗性的测定

菌株	氯丁苄霉素 (20 $\mu$ g/ml)	链霉素 (50 $\mu$ g/ml)	四环素 (15 $\mu$ g/ml)	氯霉素 (12.5 $\mu$ g/ml)	红霉素 (20 $\mu$ g/ml)	卡那霉素 (20 $\mu$ g/ml)	庆大霉素 (20 $\mu$ g/ml)	麦迪霉素 (20 $\mu$ g/ml)	核糖霉素 (20 $\mu$ g/ml)	利福平 (20 $\mu$ g/ml)	吡啶黄 (25 $\mu$ g/ml)	磺胺 (20 $\mu$ g/ml)	透氧钠 (100 $\mu$ g/ml)
KQ	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
SSII-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1404	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1883	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1885	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1886	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1888	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1890	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1892	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1894	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1593	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2362	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1691	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2117-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2013-6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1881	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C <sub>3</sub> -41	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
BS-10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2297	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2297-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2297-7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2173	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2314-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2317-3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2115	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2118	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2315	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

“-” 抑制生长; “+” 不抑制生长; “±” 抑制作用不明显

表3 链霉素、四环素和氯霉素对球形芽孢杆菌的最低抑制浓度

菌株	链霉素 (mg/ml)	四环素 ( $\mu$ g/ml)	氯霉素 ( $\mu$ g/ml)
KQ	14.9	<5	8.3
SSII-1	4.48	10	25.0
1404	7.46	5	12.5
1883	7.46	10	12.5
1885	4.48	10	12.5
1886	7.46	10	16.7
1888	7.46	5	25.0
1890	11.20	10	12.5
1892	7.46	5	12.5
1894	11.2	15	16.7
1593	18.7	10	16.7
2362	14.9	15	12.5
1691	4.48	10	>25.0
2117-2	7.46	10	25.0
2013-6	14.9	<5	25.0
1881	11.2	10	25.0
C <sub>3</sub> -41	18.7	10	16.7
BS-10	7.46	10	12.5
2297	7.46	10	25.0
2297-2	11.2	15	25.0
2297-7	18.7	15	25.0
2173	4.48	10	25.0
2314-2	18.7	10	>25.0
2317-3	7.46	15	25.0
2115	7.46	>15	6.2
2118	7.46	15	6.2
2315	11.2	>15	<2.4

为了考查 *B. s* 菌株对链霉素、四环素和氯霉素抗性特征的稳定性,我们随机挑取 C<sub>3</sub>-41 和 1593 的单菌落,斜面转接三代后,接种在 PBMV 液体培养基中,摇床培养(30℃, 220r/min)过夜,然后稀释涂布在 PBMV 平板上,30℃ 培养 12 小时,然后再分别影印在含 4mg/ml 链霉素、5 $\mu$ g/ml 四环素和 10 $\mu$ g/ml 氯霉素的 PBMV 固体平板上,30℃ 培养 24 小时,观察其生长情况。结果表明,从不含抗生素的

PBMV 平板上影印的 946 个 C<sub>3</sub>-41 菌株菌落和 1020 个 1593 菌株菌落,都能在分别含有三种不同浓度抗生素的培养基上生长。这说明, *B. s* 菌株对这三种抗生素的抗性特征在细菌的生长、繁殖过程中没有丧失,可能是一个比较稳定的表型特征。

## 讨 论

*B. sphaericus* 是一种在自然界广泛分布于土壤中的芽孢杆菌。人们一直致力于从自然界分离、筛选出杀蚊毒力更高、持效期更长和杀蚊谱更宽的菌株。但在用于分离、筛选的样品中,除极少数的 *B. s* 菌株外,还有其它大量的芽孢杆菌和非芽孢杆菌存在。热处理可以杀死大部分非芽孢杆菌,但是不能杀死芽孢杆菌,因而 *B. s* 的检出率较低,而且费时。本研究的结果可以为 *B. s* 分离、筛选提供一种强选择性培养基,即 PBMV 培养基中加入 4mg/ml 链霉素、5 $\mu$ g/ml 氯霉素和 100 $\mu$ g/ml 迭氮钠。这种强选择性培养基可以有效地从样品中分离、筛选出 *B. s* 菌株。

## 参 考 文 献

1. 张用梅等: 杀虫微生物, 第一卷, 第 98—101 页, 北京农业大学出版社, 北京, 1987。
2. Yousten AA: *Adv. Biotechnol. Processes*, **3**: 315—343, 1984.
3. 张用梅等: 杀虫微生物, 第一卷, 第 48—54 页, 北京农业大学出版社, 北京, 1987。
4. 刘娥英等: 中华流行病学杂志, **10**(7): 7—9, 1989。
5. Lacey LA: *Mosq. News*, **44**: 153—159, 1984.
6. Yousten AA et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 1532—1533, 1984.
7. 李钦白: 中华流行病学杂志, **10**(7): 31—36, 1987。
8. Hertlein BC et al.: *J. Invertebr. Pathol.*, **33**: 217—221, 1979.
9. Lacey LA & Singer S: *Mosq. News*, **42**: 537—543, 1982.
10. Burke WF et al.: *Curr. Microbiol.*, **9**: 69—72, 1983.
11. 高才昌等: 微生物学通报, **12**(3): 101—103, 1985。

## NATURALLY OCCURRING ANTIBIOTIC RESISTANCE IN *BACILLUS SPHAERICUS*

Yuan Zhiming Liu Eying Zhang Yongmei Cai Changjian Chen Zongsheng

(*Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071*)

The naturally occurring antibiotic resistance in twentyseven strains from 7 different serotypes of *Bacillus sphaericus* was investigated. The antibiotics used in this experiment are Streptomycin, Ampicilline, Tetracycline, Chloramphenicol, Kanamycin, Erythromycin, Qingdamycin, Midecamycin, Ribostamycin, Acriflavin, Rifampicin, Sulphanilamide and Azide. All strains are resist to streptomycin and azide at higher concentration and chloramphenicol at lower concentration. Most of strains are resist to tetracycline at lower concentration.

**Key words:** *Bacillus sphaericus*; Antibiotic