

4 种抗生素对枯草芽孢杆菌的体外联合抑菌试验

王育娜, 耿慧敏, 李春歌

(洛阳师范学院 生命科学系, 河南 洛阳 471022)

摘要: 为研究 4 种抗生素类药物两两混合使用对枯草芽孢杆菌的体外抑菌作用, 以 4 种抗生素类药物单独使用作为对照, 通过测量牛肉膏蛋白胨琼脂平皿上药敏片的抑菌圈直径来确定药物的抑菌作用。结果表明, 青霉素钠与盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液联用对枯草芽孢杆菌的抑菌圈平均直径为 12.8 mm, 枯草芽孢杆菌对其表现出中度敏感, 注射用头孢曲松钠分别与注射用青霉素钠、盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液联用的抑菌圈平均直径在 18~19 mm, 枯草芽孢杆菌对它们表现出高度敏感, 而其他组合对枯草芽孢杆菌的抑菌圈平均直径均大于 20 mm, 枯草芽孢杆菌对它们表现为极度敏感, 但并不是所有的联合抑菌圈平均直径都大于单独使用的抑菌圈平均直径。

关键词: 抗生素; 联用; 枯草芽孢杆菌; 抑菌

中图分类号: S816.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)08-0177-03

Combined Antibacteria Test on *B. subtilis* of Four Antibiotics *in Vitro*

WANG Yu-na, GENG Hui-min, LI Chun-ge

(Department of Life Science, Luoyang Normal University, Luoyang 471022, China)

Abstract: In order to study the combined antibacteria effect of four antibiotics on *B. subtilis in vitro*, drug susceptibility tablets on the beef extract peptone agar plate were used to evaluate the drug bacteriostasis by measuring antibacterial circle diameter. Each single antibiotic drug was used as a control. The results showed that *B. subtilis* was middle-degree susceptible to combined use of penicillin sodium and levofloxacin hydrochloride injection with 12.8 mm of antibacterial circle diameter. A higher-degree susceptibility was showed to ceftriaxone sodium for injection combined with penicillin sodium or levofloxacin hydrochloride injection, whose average antibacterial circle diameter was between 18 mm and 19 mm. The average susceptibility degree to other combinations was higher, with diameter larger than 20 mm. Not all the average antibacterial circle diameters were bigger than the four single used antibiotics.

Key words: antibiotics; combination; *B. subtilis*; bacteriostasis

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是具有典型芽孢杆菌特征的革兰氏阳性菌, 为嗜温、好氧、产芽孢的杆状细胞, 分布广泛, 易培养, 抗逆性强, 且不会产生对人和动植物有害或污染环境的产物。枯草芽孢杆菌好氧性高且含碱性蛋白酶和淀粉酶, 在动物肠道内消耗大量的氧气, 抑制动物肠道内的腐败菌, 从而预防腹泻、下痢等肠胃道疾病, 并且在体内繁殖

时可使有益菌在数量和作用强度上占绝对优势, 占据肠壁上的靶细胞, 形成生物保护屏障, 使动物机体得到恢复^[1-2]。大量文献报道, *B. subtilis* 在防治植物根部、叶部、花部和枝干病害中均有应用^[4], 是土壤中一类重要的微生物, 能够产生几十种不同结构的抗生素^[3], 其芽孢也已开始应用于疫苗学的研究中, 发展成一种新型的疫苗载体^[5]。枯草芽孢杆菌也

收稿日期: 2012-03-23

基金项目: 2010 年洛阳师范学院应用科学与技术研究基金项目(10000993)

作者简介: 王育娜(1980-), 女, 河南洛阳人, 讲师, 博士, 主要从事生化和分子生物学的教学与科研工作。

E-mail: wangna799@sohu.com

可以增强细胞免疫和体液免疫功能,提高群体免疫力,还可促进消化吸收,提高饲料利用率,防止动物因消化不良而出现“饲料便”等状况^[2,6]。因此,枯草芽孢杆菌不仅可以替代抗生素治疗猪的腹泻性疾病,而且也广泛应用于家禽畜牧养殖业、食品工业、农业、医学等领域,与人类的生活息息相关。

但近年来,由于抗生素的滥用,特别是在养殖业中的滥用,导致残留抗生素进入人体,不但使枯草芽孢杆菌产生耐药菌,还能引起人肠道菌群失调,其本身的药物残留也可滋生超级细菌,并通过食物链和环境传播,比如通过排泄物、活动方式传播到人体内,造成人类因感染超级细菌而致死。国内外对枯草芽孢杆菌和抗生素关系的研究多集中在枯草芽孢杆菌作为微生态制剂来代替某些抗生素或是用枯草芽孢杆菌来检测抗生素浓度等方面^[1,7],而关于抗生素联用对枯草芽孢杆菌的抑制作用研究却很少。鉴于此,本试验主要研究常用抗生素(注射用青霉素钠、注射用头孢曲松钠、注射用磷霉素钠、盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液)对以枯草芽孢杆菌为代表的益生菌的体外联合抑制作用,以供人们在养殖业中使用抗生素时作为参考,防止抗生素的滥用,以免对人和动物产生危害。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试药物 市售注射用青霉素钠(青),注射用头孢曲松钠(头),注射用磷霉素钠(磷),盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液(左)。

1.1.2 试验菌种 枯草芽孢杆菌由洛阳师范学院生命科学系微生物实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 药敏片的制备 选择吸水性强的优质滤纸,用打孔器打成若干直径为 8 mm 的圆形滤纸片,灭菌备用。

1.2.2 供试药液的配制及分组 将注射用头孢曲松钠、注射用磷霉素钠、注射用青霉素钠分别用无菌水配制成质量浓度为 0.002 g/mL, 0.002 g/mL, 0.005 g/mL 的溶液,盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液配成 0.005 mL/mL (NaCl) 的药液,然后各吸取 1 mL,两两混合,以 4 种抗生素单独使用作为对照。

1.2.3 抑菌测试方法(琼脂扩散纸片法) 吸取 0.1 mL 菌悬液,均匀涂布于牛肉膏蛋白胨琼脂平皿上,用无菌镊子分别夹取药敏片,充分蘸取各种药液,采用无菌操作技术将其贴在含菌平皿上,每平皿等距

离放置相同的药敏片 5 片(放置时切勿拖动),每组重复 3 次。将平皿盖上,平置于 37 °C 光照培养箱中培养 20 h 后取出,用直尺测量抑菌圈的直径(mm),取其平均值,即为该药对枯草芽孢杆菌的抑菌结果。

1.2.4 判定标准 药敏试验结果判定标准为抑菌圈直径小于 10 mm 为低度敏感,在 10~14 mm 为中度敏感,在 14~20 mm 为高度敏感,大于 20 mm 为极敏感。

1.2.5 数据处理与统计分析 对试验组和对照组数据求其平均值,应用 Excel 程序提供的数据分析工具进行单因素方差分析(LSD 检验),确定差异显著性。

2 结果与分析

2.1 注射用青霉素钠单用及与其他药液联用的体外抑菌结果

由表 1 可知,注射用青霉素钠和盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液联用的抑菌效果与其单独使用相比差异不显著,而和其他 2 种抗生素联用与注射用青霉素钠单独使用的抑菌效果差异均达到显著水平,且联合抑菌效果比单独使用的抑菌效果好。

表 1 注射用青霉素钠单用及与其他药液联用的体外抑菌结果

供试药液	混合比例 (mL : mL)	抑菌圈平均 直径/mm	敏感度
青/(g/mL)	0.005	10.6c	中
青+磷	1 : 1	20.8a	极
青+头	1 : 1	18.2a	高
青+左	1 : 1	12.8bc	中

注:相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液单用及与其他药液联用的体外抑菌结果

由表 2 可知,盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液和注射用青霉素钠联用的抑菌作用与其单独使用相比差异不显著,而和其他 2 种抗生素联用与盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液单独使用对枯草芽孢杆菌的抑菌效果差异均达到显著水平,且联合抑菌效果比单独使用效果好。

表 2 盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液单用及与其他药液联用的体外抑菌结果

供试药液	混合比例 (mL : mL)	抑菌圈平均 直径/mm	敏感度
左/(mL/mL)	0.005	11.6c	中
左+磷	1 : 1	22.0a	极
左+头	1 : 1	19.4b	高
左+青	1 : 1	12.8c	中

2.3 注射用头孢曲松钠单用及与其他药液联用的体外抑菌结果

由表 3 可知,注射用头孢曲松钠和盐酸左氧氟沙星氯化钠注射液联用与单独使用注射用头孢曲松相比,抑菌效果差异不显著,而和其他 2 种抗生素联用的抑菌效果与其单独使用相比均存在显著差异,但只有注射用头孢曲松钠和注射用磷霉素钠联用的抑菌效果好于单独使用注射用头孢曲松钠。

表 3 注射用头孢曲松钠单用及与其他药液联用的体外抑菌结果

供试药液	混合比例 (mL : mL)	抑菌圈平均 直径/mm	敏感度
头/(g/ mL)	0.002	23.0b	极
头+左	1 : 1	19.4bc	高
头+磷	1 : 1	31.4a	极
头+青	1 : 1	18.2c	高

2.4 注射用磷霉素钠单用及与其他药液联用的体外抑菌结果

由表 4 可知,注射用磷霉素钠和其他 3 种抗生素联用与注射用磷霉素钠单独使用相比对枯草芽孢杆菌的抑菌效果差异显著,但只有注射用磷霉素钠与注射用头孢曲松钠联用的抑菌效果好于单独使用注射用磷霉素钠。

表 4 注射用磷霉素钠及与其他药液联用的体外抑菌结果

供试药液	混合比例 (mL : mL)	抑菌圈平均 直径/mm	敏感度
磷/(g/ mL)	0.002	25.0b	极
磷+头	1 : 1	31.4a	极
磷+左	1 : 1	22.0cd	极
磷+青	1 : 1	20.8d	极

综上所述,这 4 种抗生素两两混合使用的效果不一定比单独使用时对枯草芽孢杆菌的抑菌效果好,这也从另一方面说明,抗生素联用治疗疾病的效果不一定比单用抗生素效果好。

3 讨论

本试验利用琼脂扩散纸片法,研究了 4 种常用抗生素对以枯草芽孢杆菌为代表的益生菌的联合抑菌作用。药敏试验表明,4 种抗生素的用量仅为平时用量的 1/10 时,枯草芽孢杆菌对它们就很敏感,且联合抑菌效果并不比单独使用一种抗生素的效果

更好,这与杜智敏等^[8]在双黄连注射液与注射用青霉素钠联用对枯草芽孢杆菌的抑制作用的研究结果相一致。

抗生素类药物对疾病的治疗和控制疗效确切。但是,长期使用同一种抗生素,机体容易产生抗药性,从而引起治疗效果下降,特别是近几年来,抗生素的滥用使人和动物体内的多重耐药菌株如大肠杆菌普遍存在,且呈现上升趋势,二重、三重耐药菌株所占比例下降,而五重、六重、七重耐药菌株占主导地位,使可选择药物的余地越来越少,随着多重耐药菌株的增加,联合用药的效果不但越来越差,还会加快人和动物体内的菌群失调,杀灭益生菌群^[9]。本试验的结果也表明,抗生素联合抑菌对益生菌的杀伤力很大,因此,在使用抗生素时不能顾此失彼,应全面考虑用药效果。

参考文献:

- [1] 俞宁,申一淋. 枯草芽孢杆菌替代抗生素治疗仔猪腹泻试验[J]. 西昌学院学报:自然科学版,2009,23(4):22-24.
- [2] 赵达,刘伟成,袁季燕,等. 枯草芽孢杆菌 B03 液体发酵条件的优化[J]. 华北农学报,2008,23(2):205-209.
- [3] 陈华,袁成凌,蔡克周,等. 枯草芽孢杆菌 JA 产生的脂肽类抗生素——inturinA 的纯化及电喷雾质谱鉴定[J]. 微生物学报,2008,48(1):116-119.
- [4] 陈华,郑之明,余增亮. 枯草芽孢杆菌 JA 脂肽类及挥发性物质抑菌效应的研究[J]. 微生物学通报,2008,35(1):1-4.
- [5] 王艳春,张兆山. 细菌芽孢——一种新型的疫苗载体[J]. 微生物学报,2008,48(1):413-417.
- [6] 高传庆. 饲用芽孢杆菌的研究和应用[J]. 山东畜牧兽医,2010,31(10):82-84.
- [7] 彭勇,陈志茹. 枯草芽孢杆菌培养一日法检测抗生素浓度的实验性研究[J]. 燕山大学学报,2005,29(5):468-470.
- [8] 杜智敏,朱波,张波. 双黄连注射液与注射用青霉素钠配伍的稳定性及体外抑菌实验[J]. 哈尔滨医科大学学报,2003,37(4):330-332.
- [9] 崔晓霞,王秀敏,侯晓礁,等. 13 种抗生素类药物对大肠杆菌的体外抑菌试验[J]. 吉林畜牧兽医,2008,29(7):9-10.