

治疗枣疯病药剂筛选方法的探索

何放亭 武红巾 陈子文

(中国农科院植保所 北京 100094)

进行治疗枣疯病药剂的筛选,因植物类菌原体(MLO)的人工培养目前尚无方法,致使此项工作难以开展。本试验用与 MLO 在分类上相近的牛类胸膜肺炎支原体(PPLO)作为枣疯病原 MLO 的替代菌,对 6 种常用抗菌素进行抑菌力测定,以期为抗枣疯病 MLO 药物的筛选提供简便、快速的方法。

1 材料和方法

供试菌株 PPLO 系由中国兽药监察所提供的标准菌株。

培养基 牛心粉(中国兽药监察所提供)3% (W/V),酵母提取物 1% (W/V),马血清 15% (V/V),用 20%NaOH 调 pH 至 7.6-7.7。

抗菌素种类 金霉素(962 单位/毫克),土霉素(872 单位/毫克),氯霉素(996 单位/毫克),以上标准品购自中国兽药监察所。四环素盐酸盐(1000 单位/毫克),卡那霉素(25 万单位/毫升),先锋霉素(500 毫克/瓶),购自海淀区医药采购批发公司。

药物抑菌力的测定方法 测定原理:
PPLO 生长产生的酸导致培养液 pH 值下降, 当含药物培养基中的 PPLO 未能引起 pH 值下降时, 则可能为该药物所抑制或杀死, 然后再转入无药剂培养液做继代培养, 能引起继代培养的培养液 pH 下降者, 证明其中 PPLO 在原代培养中仅被药剂抑制而未被杀死; 反之, 继代培养若不引起 pH 下降, 则表明其中 PPLO 在原代培养时已被全部杀灭。按规定凡 pH 值较对照降低超过 0.2 者为 PPLO 未被抑制。具体操作以卡那霉素为例。在系列稀释的 10 种含卡那霉素的培养液中接种等量的 PPLO 作原代培养, 并设无药纯

培养液及空白培养液为对照, 37℃, 4 天后分别测定 pH 值, 自 190 单位/毫升以下 pH 值变化均超过 0.2。则取 190 单位/毫升、380 单位/毫升、780 单位/毫升、1560 单位/毫升各原代培养液 0.1 毫升于无药培养基中作继代培养, 发现 1560 单位/毫升的含卡那霉素培养液的继代培养未引起 pH 值变化, 表明此浓度为卡那霉素对 PPLO 杀灭的最低浓度, 而其下一个浓度(780 单位/毫升)即为卡那霉素对 PPLO 的最小抑制浓度(见表 1)。

2 结果与讨论

据上述方法测出 6 种抗菌素对 PPLO 抑制结果(见表 2)。

表 1 卡那霉素浓度系列对 PPLO 抑菌力的测定

抗菌素浓度 (单位/毫升)	6250	3130	1560	780	390	190	95	47.5	23.7	12.9	无菌空白 培养液	无药物 培养液
原代培养(pH)	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.3	7.2	7.2	7.0	7.0	7.6	7.0
继代培养(pH)			7.6	7.1	6.9	7.0						

四环素族抗菌素对 PPLO 的抑菌力最强, 其次为氯霉素、金霉素, 以先锋霉素与卡那霉素最差。

植物病原 MLO 迄今无法人工培养, 因此对枣疯病树治疗试验, 只能一年一度地进行, 且影响因素复杂, 效率低, 所以迫切需要

表 2 6 种 抗 菌 素 对 PPLO 抑 菌 力 的 比 较

浓度 ug/ml 项 目	药 种	四环素盐酸盐	土霉素盐酸盐	绿 霉 素	金 霉 素	先锋霉素	卡那霉素
最小抑菌浓度(MIC)		0.9	1.9	7.7	7.8	317.5	780.0
最小杀死浓度(MCC)		1.9	3.8	15.4	15.6	62.5	1560

摸索一套暂时替代枣疯病病原 MLO 作供试菌的药剂筛选方法, 使其范围化。通过本试验, 应用 PPLO 作为供试菌得出 6 种抗菌素中以四环素, 土霉素抑菌力最强, 而先锋霉素、卡那霉素最差, 重复结果一致, 这与枣疯病及其它植物类菌原体病害的田间治疗试验中抗菌素的药效顺序亦吻合。植物类菌原体 MLO 与 PPLO 在分类上同为一个属, 具相近的抗药性及感药性。由于 PPLO 的人工培养较容易, 作为供试菌, 在一周内即可完成一批药剂的抑菌试验, 而且方法可要求一致, 达到规范化。鉴于以上情况, 我们认为用 PPLO 替代

菌在室内筛选枣疯病树治疗的药剂是一种简单可行的方法, 可以为治疗枣疯病的药剂研究提供较好的参考。

3 主要参考文献

1 F. E. Hahn 1979 Mechanism of action of antibacterial agents. Springer-Verlag, Bevlm Heidelberg
2 朱本明 植物类菌原体 1981 上海科学技术出版社
3 M. J. Daniels and P. G. Markham 1982 Plant and Insect mycoplasma Techniques.