

一株抗生素产生菌的研究初报*

蓝希钊 胡军华 文红秀 陈家莲 周泽扬**

(西南农业大学蚕桑丝绸学院农业部蚕桑学重点实验室 重庆 400716)

摘要:从土壤中筛得一株能产生抗生素的细菌,经鉴定属于假单胞菌科假单胞菌属。抗菌谱分析表明,它对革兰氏阳性细菌有较强的抗性,而对革兰氏阴性细菌抗性弱。其活性成分能耐受 100℃, 0.5h 水浴,且能通过 0.22 μ m 微孔滤膜。

关键词: 抗生素, 细菌, 药敏试验

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 05-0030-05

PRELIMINARY STUDY ON AN ANTIBIOTIC-PRODUCING BACTERIUM

LAN Xi-Qian HU Jun-Hua WEN Hong-Xiu CHEN Jia-Lian ZHOU Ze-Yang

(The Key Sericultural Laboratory of Southwest Agricultural University, Chongqing 400716)

Abstract: An antibiotic-producing bacterium, which was numbered as 20^{*}-5, was separated from the soil in Chongqing. It was identified as the member of pseudomonas. Gram positive bacteria are badly suppressed by it. The antibiotic secreted by 20^{*}-5 can endure 100℃ for half an hour, and it can also go through the ultrafiltration membrane with pores of 0.22 μ m.

Key words: Antibiotic, Bacterium, Sensitivity test

在进行微生物资源的开发利用研究过程中,从重庆市近郊土壤中分离到一株能产生抗生物物质的细菌,编号为 20^{*}-5。为对其进行深入的研究,我们对该菌进行了分类鉴定,调查了其抗菌谱,并对其抗性物质的某些性质进行了初步的探索,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌种的分类鉴定

1.1.1 培养特征的观察:分别在 LB、PDA 平板上划线接种,28℃ 培养 24 ~ 48h。分别在 LB、PDA 液体培养基上接种,28℃ 摇床振荡 (180r/min) 培养 24 ~ 48h。

1.1.2 菌体形态观察:参照周德庆,沈萍,任欣正,等^[1-3]介绍的方法,对 20^{*}-5 进行革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色、鞭毛染色并观察其运动性。

1.1.3 生理生化反应:参照周德庆,任欣正,等^[1-3]介绍的方法,并根据其它介绍略作改动。

1.2 抗菌谱调查及抗性成分理化性质初探

1.2.1 指示菌:采用由本室及西南农业大学生物技术中心保存的 14 种细菌,其中白-9 为革兰氏阳性菌,尚未鉴定。

1.2.2 样品处理:发酵液经 12,000r/min 离心 15min,取上清液作为样品 1 (S₁);用 0.22 μ m 微孔滤膜超滤 S₁,取滤过液作为样品 2 (S₂);S₁ 经 80℃ 水浴 0.5h,作为样品 3 (S₃);S₁ 经 100℃ 水浴 0.5h,作为样品 4 (S₄)。

* 重庆市科委院土基金资助项目。(No. 2000-34)。

** 联系人

收稿日期: 2001-05-08, 修回日期: 2001-11-30

1.2.3 药敏试验: 在 LB 半固体培养基中加入 1% 对数生长期 ($OD_{600} = 0.6 \sim 1.2$) 的各指示菌, 制成混菌平板。用 4mm 孔径的小管在平板上打孔, 每平板打 5 个孔, 分别加入 S_1 、 S_2 、 S_3 、 S_4 , 另一孔加入 LB 液体作为阴性对照, 每孔加入 $10\mu\text{L}$ 样品, 每种指示菌做两个平板。37℃ 培养 12 ~ 24h。

2 结果与分析

2.1 菌种分类鉴定结果

2.1.1 培养特征: 在 PDA、LB 平板培养基上菌落完全相同, 平铺边缘不整, 呈扩展状, 表面湿润, 易用接种针挑起, 产生水溶性蓝绿色色素。菌体在斜光照射下呈现荧光。该菌在 PDA、LB 平板上形成的菌落如图 1 所示。

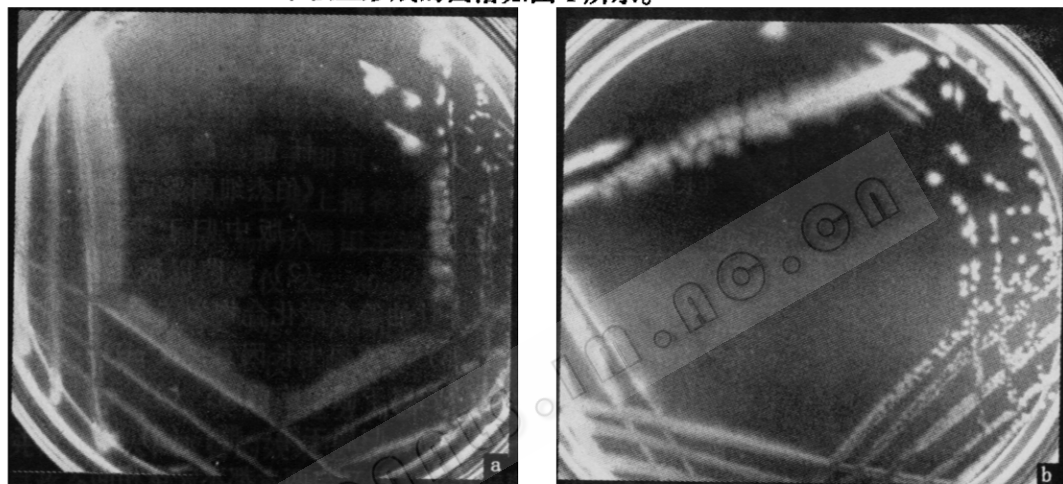


图 1 20^8-5 在平板上 28℃ 培养 36h 后形成的菌落形态 (1,600×)

a PDA 平板, b LB 平板

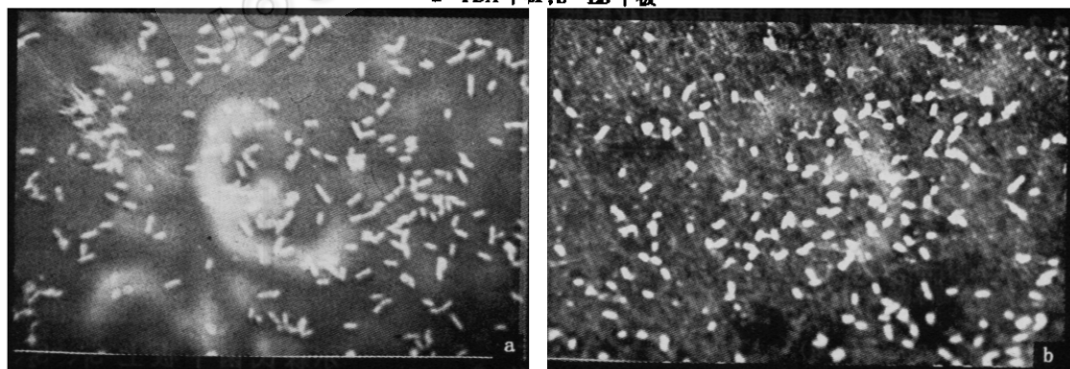


图 2 20^8-5 在显微镜下的形态 (1,600×)

a 革兰氏染色 b 银染法鞭毛染色

在 LB、PDA 液体培养 48h 后, 液面有菌膜, 下端有沉淀。菌液常呈蓝绿色, 但即使是同一批发酵的, 不同试管、不同三角瓶装的菌液也可能有的呈蓝绿色, 有的呈黄色。菌液的颜色不同并不影响其抗菌活性。在促芽孢形成培养基上生长 6d 后也不能检出芽孢。

2.1.2 菌体形态及运动性: 革兰氏染色呈红色, 杆状, 大小为 $0.2 \sim 0.5\mu\text{m} \times 2 \sim 3\mu\text{m}$,

用 3% 的 KOH 处理 1~2min 后针挑呈粘稠丝状,说明该菌为革兰氏阴性杆菌。革兰氏染色后在显微镜下的形态如图 2 (a) 所示。

荚膜染色时在黑色菌体周围没有看到透明圈,表明没有荚膜。用 0.03% 美蓝溶液作运动性观察时,压入气泡则能活跃地运动,无气泡则不能运动。银染法染色可看到有极生 1~2 根鞭毛。鞭毛染色后在显微镜下的形态如图 2 (b) 所示。

2.1.3 生理生化结果:在按照资料介绍的方法进行试验后,各生理生化反应结果明确,符合要求。其结果见表 1。

表 1 20⁻-5 的生理生化特征

特征	结果	特征	结果
氧化酶反应	+	接触酶反应	+
好氧性	严格好氧	葡萄糖氧化发酵	氧化产酸但不发酵
碳源利用	葡萄糖	胨青素	-
	海藻糖	果聚糖形成	-
	甘油	明胶水解	+
	肌醇	精氨酸双水解酶	+
荧光色素	+	淀粉水解	-
水解 PHB	-	生长酸碱度	pH3.6
生长温度	40℃		pH4.5
	41℃		pH7.0

注: + 表示阳性, - 表示阴性

运动,呼吸代谢,不发酵,能利用葡萄糖、海藻糖、甘油等含碳化合物为碳源,接触酶反应阳性,氧化酶反应阳性,属于假单胞菌科;(3) 不需要生长因素,在 pH3.6 以下不能生长,不形成粘稠的树枝状突起物和絮状物,归属于假单胞菌属;(4) 不需要生长因素,不积累聚 β-羟基丁酸盐作为细胞内的碳贮物,归属于第一群;(5) 从生理生化反应来看,与铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌较接近,但又与两者都不完全相同。

由上可知,待测菌 20⁻-5 属于假单胞菌科、假单胞菌属、第一群。

2.2 活性成分的抗菌谱及其部分理化特性

各指示菌在经过 37℃ 培养 24h 后均匀地长满了平板,所有未添加活性成分的阴性

表 2 20⁻-5 的抗菌谱及抗性成分的部分理化特性调查结果

指示菌样品	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅
苏云金芽孢杆菌 (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	++	++	++	++	-
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	++	++	++	++	-
蜡质芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	++	++	++	++	-
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	+	+	+	+	-
白-9	++	++	++	++	-
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	-	-	-	-	-
鹅大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	-	-	-	-	-
耶尔森氏菌 (<i>Yersinia</i> spp.)	-	-	-	-	-
鸡耶尔森氏菌 (<i>Yersinia</i> spp.)	-	-	-	-	-
鸭耶尔森氏菌 (<i>Yersinia</i> spp.)	+	+	+	-	-
亚利桑那沙门氏菌 (<i>Salmonilla arizonae</i>)	-	-	-	-	-
沙门氏菌 (<i>Salmonilla</i> spp.)	-	-	-	-	-
鸡克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella</i> spp.)	-	-	-	-	-
孔雀克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella</i> spp.)	-	-	-	-	-

注: ++ 表示抑菌圈较大, “+” 表示抑菌圈较小, “-” 表示没有出现抑菌圈

依据上述结果,参照《伯杰细菌鉴定手册》^[4] 及《植物病原细菌的分类和鉴定》^[1],对 20⁻-5 进行分类鉴定:
(1) 该菌为革兰氏阴性,杆菌,严格好氧,在《伯杰细菌鉴定手册》第八版中归于第七部分;
(2) 该菌以极生鞭毛运

动;对照都没有出现抑菌圈;在苏云金芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、白-9 平板上, S₁、S₂、S₃、S₄ 周围出现明显的抑菌圈;在耶尔森氏菌平板上 S₁、S₂、S₃、S₄ 周围出现微小的抑菌圈;在其它平板上则无抑菌圈。这表明 20⁻-5 的抗性成分对革兰氏阳性细菌有较强的抗性,而对革兰氏阴性细菌则抗拒性较弱。同时, S₃、S₄ 是经过 80℃、

100℃水浴 0.5h 的, 它们对各细菌的抗性与 S_1 、 S_2 相同, 说明其中的抗性成分能耐较高温度。另外, S_2 是发酵液经过 0.22 μ m 微孔滤膜超滤的滤过液, 说明其抗性成分是一种小分子。该菌抗菌谱及抗性成分的理化特性调查结果见表 2, 部分药敏试验结果见图 3。

据报道^[5-10], 假单胞菌属在生物防治中起着重要作用, 尤其是荧光假单胞菌, 已发现它可产生多种抗生素 (Pyrrolnitrin、Hydrogen Cyanide、Pyoluteorin、2, 4-diacetylphloroglucinol、Phenazine-1-carboxylic acid、Oomycin), 对 take-all、damping off of cotton 等重要植物疾病有拮抗作用, 且使用也方便, 只用菌液浸泡种子即可。以 PCA 为例, 若每 m^2 土地上播各种 270 粒小麦, 则每 hm 所需用于浸种控制 take all 的量仅 55 ~ 80mg, 而用化学农药则要 90g, 两者相差 3 个数量级。前者不仅节约成本, 还有利于环保。美国在这方面研究得较深入, 取得的效果也较好, 已将合成几种抗生素的基因克隆, 且从生化水平和基因水平上调控其抗生素的生物合成。我国这方面相对滞后, 仅有少量报道分离到这类菌, 且仅分析研究了其抗性物质的某些性质, 在生物合成

调控水平及基因水平等方面鲜见研究报道。本菌株据我们最近初步分析研究推测有多种活性成分同时存在。该菌株类群在生产抗菌物质等方面的研究, 尤其在生物防治方面研究未见报道, 必要进一步研究。特别是对其在生物防治方面利用的可能性有深入研究的必要。

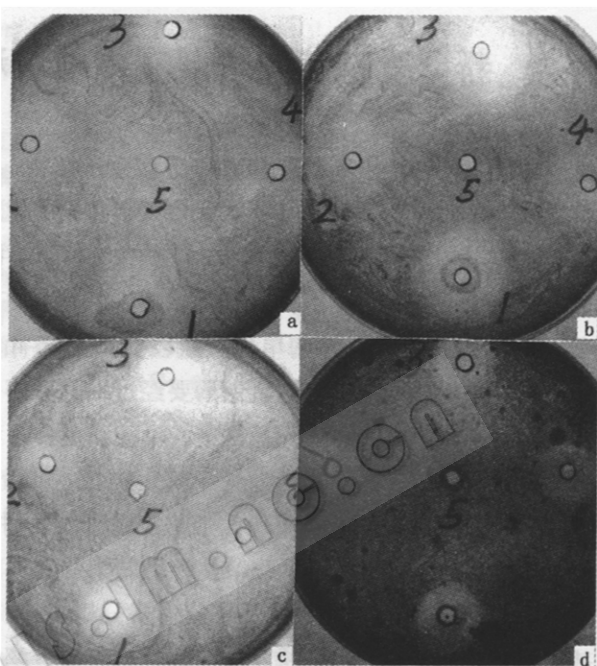


图 3 20°-5 对部分细菌的抗性

指示菌分别为: a 苏云金芽孢杆菌, b 枯草芽孢杆菌,
c 白-9, d 蜡质芽孢杆菌

各序号所代表的样品:

- 1 发酵液经 12, 000r/min 离心 15min 后的上清液,
- 2 样品 1 经 80℃水浴 0.5h, 3 样品 1 经 100℃水浴 0.5h,
- 4 样品 1 经 0.22 μ m 微孔滤膜超滤后的滤过液,
- 5 LB 液体培养基

参考文献

- [1] 任欣正主编. 植物病原细菌的分类和鉴定 (第 1 版). 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [2] 沈萍主编. 微生物学实验 (第 3 版). 北京: 高等教育出版社, 1996. 35 ~ 36.
- [3] 周德庆主编. 微生物学实验手册 (第 1 版). 上海: 上海科学出版社, 1986.
- [4] RE 布坎南, NE 主编. 伯杰细菌鉴定手册 (第 8 版). 北京: 科学出版社, 1984.
- [5] 彭于发, 陈善铭. 植物病理学报, 1990, 20 (3): 209 ~ 233.
- [6] 刘杰贤, 咸洪泉. 中国甜菜糖业, 1995 (5): 51 ~ 53.
- [7] Thomasow LS, Weller DM, Bonsall RF., Applied and Environmental Microbiology, 1990, 56: (4): 908 ~ 912.
- [8] Kraus J, Loper JE. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61 (3): 849 ~ 854.

[9] Duffy B K, Defago G. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65 (6): 2429 ~ 2438.

[10] Schnider U, Keel C, Blumer C. J-bacteriol Washington D C: American Society for Microbiology, Sept 1995.