

绿针假单胞菌色素的研究

戴祥鹏 刘惠敏 曹杰 张宪武

(中国科学院林业土壤研究所,沈阳)

对假单胞菌产生的色素已有报道^[1-10]。我们从我国东北地区的土壤中分离出一株假单胞菌,经鉴定定名为绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)。在斜面上培养,它能产生色素结晶(见图1),本文报道这种结晶的分离方法、物理化学特性、抗菌性能和毒性。



图1 绿针假单胞菌产生的色素结晶

材料和方法

一、菌株

绿针假单胞菌。

二、色素的产生条件

将绿针假单胞菌培养在斜面培养基上,培养基含(%):蛋白胨1,牛肉膏1,NaCl0.5,蔗糖2,琼脂2,pH7.2。用前须活化。在斜面培养基上培养48h后,接种液体培养基(含蛋白胨1%,KNO₃0.1%,NaCl0.5%,甘油2%,pH7.2),500ml三角瓶装100ml,接种量2—5%(V/V),28℃振荡(240rpm/min)培养5天,色素即逐渐形成。

三、色素的分离、结晶方法

1. 溶剂萃取法分离结晶:培养5天后的培养液,加浓盐酸酸化至pH2.0,然后按1:1(V/V)加入氯仿提取,分离出氯仿层,加少许无水亚硫酸钠脱水,减压浓缩即得黄色结晶,最后用乙醚、甲醇等溶剂洗涤结晶1—2次。

2. 沉淀法分离纯化结晶:静止培养7天后的培养液,用布氏漏斗过滤、静置滤液,取其结晶物,60℃烘干。烘干物置研钵中加入氯仿或

丙酮多次萃取,合并萃取液过滤、减压浓缩即可得到黄色针状结晶。

3. 物理化学特性的鉴定: 紫外吸收光谱用 Hilger 分光光度计测定, 红外吸收光谱用 SP-200 型红外分光光度计测定。碳和氢含量的确定用燃烧法。氮的测定根据 Dumas 微量分析法。熔点的测定用开口毛细管法。结晶的抗菌性能测定用纸片法和杯碟法。对植物病原真菌的抗菌性能测定, 采用平板杯碟法。

4. 毒性测定: 用结晶悬液测定对小白鼠的毒性。急性毒性试验用结晶悬液灌胃的方法。试验小鼠平均体重 18g, 每组 5 只, 共 5 组。使用 5 种剂量, 每只小鼠灌胃 0.5ml, 灌胃后 72h 观察结果。

结果与讨论

一、结晶的物理、化学特性

1. 紫外吸收光谱的测定: 结果见图 2。

图 2 说明在 250 和 365 nm 处有二个强吸收峰。

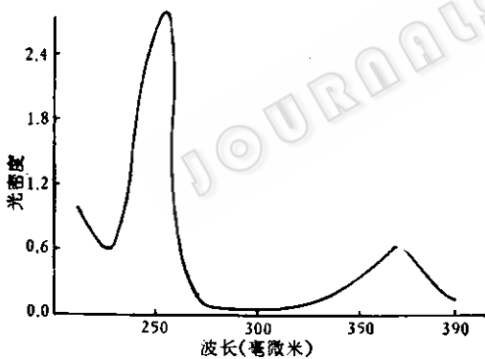


图 2 结晶的紫外吸收光谱

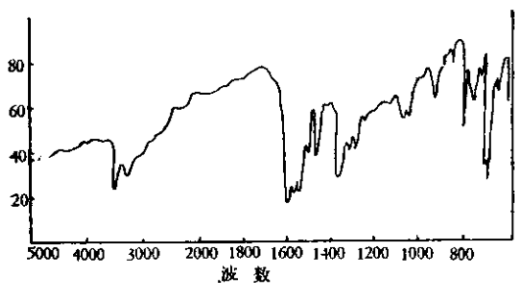


图 3 结晶的红外吸收光谱

2. 红外吸收光谱的测定: 结果见图 3。

3. 元素分析: 实验值 (%): C 70.10; H 3.97; N 18.70; O 7.23 (差值)。计算值 (%): C 69.94; H4.06; N 18.83; O 7.17。(计算值按 $C_{13}H_9H_3O$ 计算)。结晶的熔点是 241°C。

上述结果说明, 我们所得到的结晶是吩噻- α -羧基酰胺。

二、抑菌试验

结果见表 1。

表 1 吩噻- α -羧基酰胺对于细菌和植物病原真菌的抗菌作用

试 验 菌	抑菌圈直径 (mm)*
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	>15
枯草杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	>15
炭疽杆菌 (<i>Bacillus anthracoides</i>)	20
分枝杆菌 (<i>Mycobacterium sp.</i>)	14
柑橘溃疡病菌 (<i>Xanthomonas citi</i>)	>18
水稻白叶枯病菌 (<i>Xanthomonas oryzae</i>)	17
菠萝黑心病菌 (<i>Ceratostomella sp.</i>)	15-20
洋麻炭疽病菌 (<i>Colletotrichum hibisci</i>)	15-20
香蕉炭疽病菌 (<i>Gloeosporium musarum</i>)	30

* 对植物病原真菌所采用的杯碟法中, 每一小杯内含 30% 的乙醇吩噻- α -羧基酰胺溶液 0.2 毫升, 内含吩噻- α -羧基酰胺约 200 微克。平板培养于 28°C, 60 小时后观察结果, 对照为 30% 的乙醇。

吩噻- α -羧基酰胺对水稻白叶枯病菌和菠萝黑心病菌的抗菌试验结果见图 4、5。关于吩噻衍生物对水稻白叶枯病的防治, 日本已有报道^[12-14]。

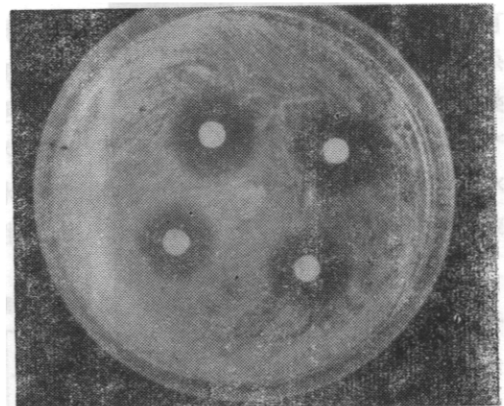


图 4 结晶对水稻白叶枯病菌的抑制作用(纸片法)

三、吩噻- α -羧基酰胺的毒性

为了确定该物质能否应用, 我们进行了毒

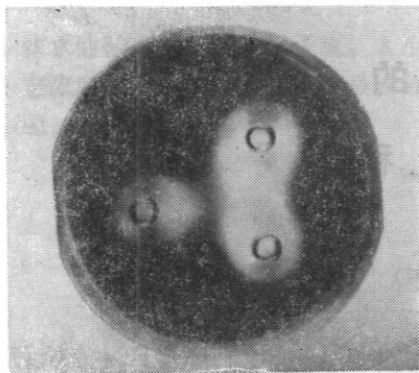


图5 结晶对菠萝黑心病菌的抑制作用(杯碟法)

表2 不同剂量的吩噻- α -羧基酰胺淀粉
悬液灌胃后对小鼠的毒性

灌胃悬液浓度 (毫克/毫升)	每只小鼠灌胃 剂量 (毫克/只)	小鼠每克体重 的灌胃剂量 (毫克/克)	死亡率
5	2.5	0.14	0
10	5.0	0.28	0
50	25.0	1.39	0
100	50.0	2.78	0
200	100.0	5.56	0

性试验。供试的5组小白鼠所用的药量分别为

每 ml 5、10、50、100、200 毫克。不同剂量灌胃后的结果见表 2。

表 2 的数据表明,小白鼠用不同剂量的吩噻- α -羧基酰胺灌胃 72 小时后,各剂量组均未发现死亡,也未观察到任何急性中毒症状。这表明吩噻- α -羧基酰胺的毒性很低。

参 考 文 献

- [1] Wred, F. and Strack, E.: *Z. Physiol. Chem.*, **181**: 58—76, 1926.
- [2] Kogl, F. and J. J. Postswsky: *Ann. Chem.*, **480**: 280—297, 1930.
- [3] 武田六郎: *醱酵工学雜誌*, **35**: 281, 1958.
- [4] 武田六郎: *ibid.*, **36**: 286, 1958.
- [5] 武田六郎: *ibid.*, **37**: 15, 1959.
- [6] 武田六郎,中西造: *ibid.*, **37**: 54, 1959.
- [7] 武田六郎,中西造: *ibid.*, **37**: 59, 1959.
- [8] Murayam, A. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **33** (11): 1599—1605, 1965.
- [9] Lee, E. G. H. and C. C. Walden: *Appl. Microbiol.*, **17**: 520, 1969.
- [10] 东原,孝規,佐藤,照本: *醱酵工学雜誌*, **48** (2): 73, 1970.
- [11] Stammer, C. and A. Taurins: *Spectrochimica Acta*, **19**: 1625—1653, 1963.
- [12] 渡边,关沢,小田: 特許公告,昭 42-14831,1967.
- [13] 渡边,关沢,小田: 特許公告,昭 43-5833,1968.
- [14] © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>