

# 产氨基糖苷抗生素芽孢杆菌 6012 的分类鉴定、 发酵和抗菌活性

周家惠 王小泉 张先仪

(四川制药厂,成都)

从我厂附近土壤中分离到一株芽孢杆菌,此菌株产生的抗生素 6012 为一多组份广谱抗生素。其中 A<sub>1</sub> 组分经紫外吸收光谱,红外吸收光谱,氢核磁共振谱和质谱测定初步确定,是由二个氨基糖和一个 2-脱氧链霉素连接构成的碱性水溶性氨基糖苷抗生素<sup>[1]</sup>。本文报道该菌的形态、培养和生理特性,发酵和抗菌活性。

## 材 料 和 方 法

1. 菌种鉴定所用方法和细菌的培养特性和生理特性的描述参照文献[2—5]进行。

2. 分离培养基组成(%)为:蛋白胨 0.6, 酵母膏 0.3, 肉膏 0.15, 琼脂 2.0, pH 7.4—7.8。斜面培养基再加入 2% 葡萄糖。

3. 发酵种瓶培养基(%): 淀粉 4.0, 花生饼粉 2.6, 硫酸铵 0.6, 碳酸钙 0.3。

4. 发酵培养基(%): 淀粉 6.0, 花生饼粉 3.0, 黄豆饼粉 1.0, 氯化铵 0.3, 碳酸钙 0.3, 硫酸锰 1r/ml。

## 结 果

### (一) 产生菌的分类鉴定

该菌在葡萄糖、蛋白胨斜面上 37℃ 培养 1—2 天,生长良好,厚不透明,灰白至米黄色,分泌玫瑰色色素。细胞杆状,大小为  $0.68—0.85 \times 1.28—7.53\mu$ , 末端圆,不分支,运动。革兰氏染色阳性。48 小时产生孢子囊,圆筒形,大小约  $0.85 \times 2.55\mu$ , 芽孢位于中央或近中央,不肿大膨胀,椭圆形,大小为  $0.68 \times 1.02\mu$  左右。

在分离培养基上生长 3 天的菌落如图 1 所示。A 和 B 为粗糙型, C 为光滑型。

该菌能利用甘油、D-木糖、D-葡萄糖、D-

半乳糖、D-甘露醇、蔗糖、麦芽糖和淀粉产酸但不产气。不利用乳糖,利用酪氨酸但不分泌色素,在 7% 氯化钠肉汤中生长,使石蕊牛奶碱化,明胶直刺液化,不产吲哚,利用柠檬酸,还原硝酸盐为亚硝酸盐,尿酶反应阳性,产生过氧化氢酶,VP 试验阳性,在醋酸铅培养基中产生硫化氢,不溶血。

根据上述观察结果并依据伯杰氏鉴定细菌学手册第八版的描述,抗生素 6012 产生菌具有典型的枯草芽孢杆菌的特点,因此将此菌定名为枯草芽孢杆菌 6012 (*Bacillus subtilis* 6012)。

### (二) 发酵

测定了各种培养基组份对抗生素发酵生产的影响。较适碳源有淀粉、甘油和糊精;氮源可用花生饼粉或黄豆饼粉;无机氮源可用氯化铵或硫酸铵;锰离子可促进菌体的生长、碳源的利用和芽孢形成。1000 ml 种子瓶装培养基 100 ml。接种 6012 菌株后在旋转摇床振荡培养 1 天,以 0.2% 接种量接入 100 L 不锈钢发酵罐中,内装 50l 发酵培养基。发酵 pH 6.3—7.0,温度为 30—35℃,通气量约为 1:1(1VVM)。通气搅拌培养 114 小时的抗生素产量为 70—120 mg/l。

发酵液经纸层析测定,如在溶剂系统 I,即甲醇:5% 氯化钠 (2:1),上行层析可分离出 3 个组分,主要组分抗生素 6012 A,能抑制革兰氏阴性菌,比移值  $R_f = 0.75$ ; B 组分只抑制革兰氏阳性菌,  $R_f = 0.93$ ; C 组分只抑制真菌,  $R_f = 0$ 。发酵液如在溶剂系统 II,即丁醇:吡啶:乙酸:水 = 6:4:1:3 中上行层析,用大肠杆

承李玉德、蔡顺养、岑寇新等同志提出许多宝贵意见;四川医学院药理学教研室协助进行药理试验;成都药械厂给予大力协助,在此一并致谢。

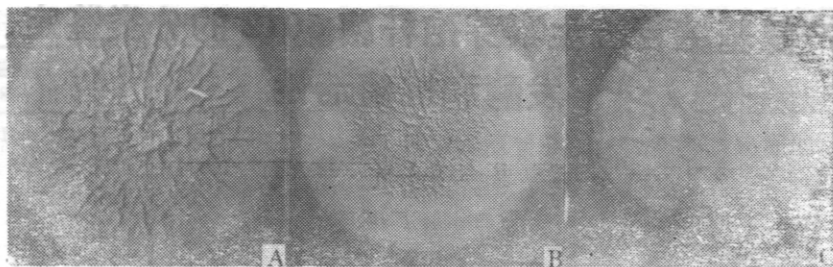


图1 产生菌的菌落形态

表1 6012 A<sub>1</sub> 的抗菌谱

测 定 菌	MIC( $\mu\text{g/ml}$ )	测 定 菌	MIC( $\mu\text{g/ml}$ )
大肠杆菌 1133 <i>Escherichia coli</i>	0.2	肺炎克雷伯氏菌 46114 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.4
大肠杆菌 44102	0.2	普通变形菌 1.200 <i>Proteus vulgaris</i>	0.2
大肠杆菌 C-111	0.2	普通变形菌 O <sub>x</sub> 19	0.2
绿脓杆菌 10104 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1.6	金黄色葡萄球菌 209 P <i>Staphylococcus aureus</i>	0.2
绿脓杆菌 1.50	0.8	短小芽孢杆菌 8241 <i>Bacillus pumilus</i>	0.2
绿脓杆菌 1.926	0.8	枯草芽孢杆菌 6633 <i>Bacillus subtilis</i>	0.2

菌及绿脓杆菌作生物显影,发现A组分还可分为3个组分:A<sub>1</sub>的Rf值为0.05,可抑制大肠杆菌和绿脓杆菌生长;A<sub>2</sub>的Rf值为0.40,A<sub>3</sub>为0.30,均只抑制大肠杆菌生长。

A<sub>1</sub>组分抗菌活性最强,从纸层析抑菌面积计算,A<sub>1</sub>约占发酵液总活性的30—40%,一般发酵温度为28—34℃,如为35℃时,则抗绿脓杆菌活性有所增强,抗大肠杆菌活性下降。

### (三) 抗菌活性

6012 A<sub>1</sub>的最小抑菌浓度(MIC)试验,是采用常规肉汤二倍稀释法进行,试验结果观察3天,由表1结果可看出6012A<sub>1</sub>是一个广谱抗生素。低浓度即能抑制包括绿脓杆菌在内的革兰氏阳性与阴性菌的生长。

## 讨 论

枯草芽孢杆菌可产生66个不同的多肽抗生素<sup>[6]</sup>,如枯草菌素、枝杆菌素、新杀菌素等<sup>[7]</sup>。

能产生氨基糖苷类抗生素的细菌有 *Bacillus circulans*, *B. vitellinus* 和 *Pseudomonas sorbicini* nov. sp.<sup>[8]</sup>。至于枯草芽孢杆菌能产生抑制绿脓杆菌的氨基糖苷类抗生素,我们这是首次报道。

## 参 考 文 献

- [1] 褚志义等:上海第一医学院学报,10(4):251—256,1983。
- [2] Skerman, V. B. D.: A quideto the identification of the genera of bacteria, The Williams and Wilkins company, Baltimore, 1959.
- [3] 凌代文等:微生物,2(6):275—282,1960。
- [4] 王大相:《细菌分类基础》,科学出版社,北京,1977。
- [5] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: Bergey's manual of determinative bacteriology 8th ed., The Williams and Wilkins company, Baltimore, 529—550, 1974.
- [6] Hopwood, D. A. and M. J. Merrick: *Bact. Rev.*, 41(3): 595—635, 1977.
- [7] Katz, E. and A. L. Demain: *Bact. Rev.*, 41(2): 449—474, 1977.
- [8] 周家惠:国外药理学抗生素分册,4(2):93—97,1983。