

串珠镰刀菌素降解菌的筛选及特性分析*

陈卫琴 章 红 戴鹏高 李季伦

(中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094)

摘 要 :从黑龙江省镜泊湖附近的草甸土中筛选到一株能以串珠镰刀菌素(MON)为唯一碳源和能源生长的 Y21-2 菌株。该菌在含 500 μ g/mL MON 的基础培养液中菌数从 10^7 增长至 10^{10} 。根据常规形态特征分析、生理生化性状、G+C mol% 含量测定及 16S rDNA 基因序列分析将其鉴定为根瘤菌科的苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)。静息细胞试验证实 Y21-2 菌株细胞内确实存在能够降解 MON 的酶系。

关键词 :串珠镰刀菌素 降解 苍白杆菌属

中图分类号 :Q936 文献标识码 :A 文章编号 :0001-620X(2000)05-0513-17

串珠镰刀菌素(moniliformin ,简称 MON)是一种由镰刀菌产生的水溶性真菌毒素 ,其分子式为 $C_4H_3O_3R$ (R = Na 或 K) ,化学名称为 3-羟基-环丁-3-烯-1,2-二酮(3-hydroxycyclobutene-1,2-dione)。该毒素通常以钾盐或钠盐的形式存在于自然界^[1]。已陆续发现共计有 18 种镰刀菌可以产生 MON ,其中串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)和胶孢镰刀菌(*F. Subglutinans*)是玉米、水稻、小麦等粮食中常见的污染菌 ,曾报道一株胶孢镰刀菌在玉米固体培养基上 25 $^{\circ}$ C 培养 5 周时产毒量高达 33.7g/kg 培养物^[2]。

串珠镰刀菌素对不同种动物皆具有急性毒性 ,按照毒理学急性毒性剂量分级标准评定 ,该毒素属于剧毒级^[3]。各实验动物以不同途径染毒后 ,均可在 1~2h 内死亡。中毒症状均出现渐进性肌无力、心跳加快、呼吸困难、发绀、昏迷直至死亡^[4,5]。病理学检查发现 ,病变主要在心肌。^[4]实验表明 ,MON 可能是一种以心肌坏死为主的地方病——克山病的致病因子^[6,7]。该病曾流行于我国许多省市 ,且最近在俄罗斯的 Transbakalia^[8]及非洲^[9]一些以玉米为主食的国家都有类似心肌损伤疾病的报道。MON 在世界范围内的玉米、大麦、小麦上都有污染 ,严重危害畜牧业生产及人类身体健康。且因其有较强的植物毒性 ,引起作物枯萎和坏死而造成粮食减产^[1,2]。章红等曾采用传统的物理化学方法对粮食和水中的串珠镰刀菌素进行了去毒研究。其中 O_3 等脱毒方法虽去毒效果较好 ,但大规模应用尚有困难 ,且影响粮食外观和质地^[10]。探索一条生物降解的途径 ,筛选能够降解 MON 的微生物 ,并将编码降解该毒素的酶基因克隆到镰刀菌污染作物(如玉米)上的生物解毒方法 ,不仅能从根本上大大降低粮食中 MON 含量 ,且能减少 MON 引起的植物病害和粮食减产 ,避免使用化学物质(杀真菌剂或抗性诱导剂)或引进生物防治微生物等引起的环境公害 ,从而有着广泛的经济和环境效应。

* 日本 The United Nations University 资助项目

作者简介 :陈卫琴(1973—) ,女 ,江苏省江阴市人 ,1999 年获中国农业大学理学硕士学位 ,主要从事真菌毒素的生物解毒工作 ,现于美国密西根州立大学攻读博士学位

收稿日期 :1999-09-13 ,修回日期 2000-01-16© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1 材料和方法

1.1 土样及霉变玉米样品

土样和霉变玉米样品分别采自黑龙江、内蒙古、辽宁、河北、河南和北京等省市。

1.2 毒素

MON 由本实验室制备^[11] 纯度为 99%。

1.3 培养基

1.3.1 筛选用培养基 :富集培养液 :每升中含胰蛋白胨 8g ,酵母膏 4g ,甘油 1mL ,pH7.0 ;毒素培养液(MA)(分离多数细菌用) :每升中含胰蛋白胨 8g ,酵母膏 4g ,pH7.0 ;毒素培养液(MB)(分离嗜酸细菌用) :每升中含胰蛋白胨 3g ,酵母膏 3g ,0.1MPa 蒸汽灭菌 20min 后用灭菌的 10% 乳酸调 pH 值至 5.5。将 MON 配成 2mg/mL 水溶液 过滤灭菌后分别加入到 MA、MB 培养液中 ,配成 MON 含量分别为 100μg/mL、200μg/mL、300μg/mL、500μg/mL 的毒素培养液。

1.3.2 基础培养液 :每升中含 NH₄NO₃ 1.00g ,MgSO₄·7H₂O 0.15g (NH₄)₂SO₄ 0.50g ,KH₂PO₄ 0.50g ,NaCl 0.50g ,K₂HPO₄ 1.50g ,pH7.0。灭菌后加入过滤灭菌的 MON 水溶液 ,使 MON 终浓度达 500μg/mL。

1.4 微量富集培养筛选法

采用在 2mL Eppendorf 管中 30℃、150r/min 摇床培养 100μL 菌液的微量培养方法。将土样或霉变玉米样品在无菌水中制备成菌悬液后以 10% 接种量接种于富集培养液 ,培养 1~2d 后再以 10% 接种量接种于新鲜的含 100μg/mL MON 的 MA、MB 毒素培养液中培养 ,以后每隔 4d 移种一次 ,并逐渐增加 MON 含量分别为 200、300、500μg/mL。当 MON 浓度达 500μg/mL 培养 4d 后取样经薄层层析法(TLC)分析毒素含量 ,同时以未接种的相同毒素浓度的培养液为空白阴性对照。将经 TLC 检测毒素消失的混合菌悬液以 10% 接种量接种于以毒素为唯一碳源的基础培养液中 ,同时以未接种的相同毒素浓度的培养液为空白阴性对照 ,培养一周后用 TLC 检测毒素有无消失。毒素降解阳性菌悬液以稀释平板法涂布于固体琼脂平板 ,挑出菌落形态各异的单菌落菌株 ,纯化后接种以毒素为唯一碳源的基础培养液(MON 500μg/mL) ,检测有无解毒能力。并进一步接种于以 MON 为唯一碳源的 White 培养液^[12、13]中以确定该菌株利用 MON 生长的能力。

1.5 菌株鉴定

将筛选到的降解菌进行传统形态及生理生化性状鉴定。采用热变性温度法测定其 G + Cmol% 含量 ,并参考文献^[14] 测定其 16S rRNA 基因序列 ,利用 BLASTN 软件在非重复的 GeneBank + EMBL + DDBJ + PDB 基因库中进行同源性比较^[15] 并将其鉴定到属。

1.6 降解菌 MON 降解能力测定

将降解菌株经无菌水洗涤菌体两次后接种于含 500μg/mL MON 基础培养液中使菌浓达 10⁷ ,30℃ 150r/min 培养 ,其间每隔一定时间取样 ,稀释平板法测活菌数 ,同时采用离子对高压液相色谱法(HPLC)检测样品中毒素含量以观察该菌株生长及毒素消耗。

1.7 静息细胞试验

为了证明 Y21-2 菌株细胞内具有能利用 MON 的酶系 ,制备新鲜静息细胞 ,并将其

悬浮于基础培养液中,调菌浓为 $OD_{600} = 20$,取 1.0mL 菌悬液 ,加入 MON 至终浓度 $500\mu\text{g/mL}$,以 $500\mu\text{g/mL}$ MON 基础培养液作为阴性空白对照。 30°C 150r/min 摇床培养。从毒素加入起每隔 1h 取样 ,HPLC 检测培养液中毒素含量($\mu\text{g/mL}$) ,绘制毒素消耗曲线。

1.8 分析方法

1.8.1 MON 薄层层析法(TLC)定性分析 :采用高效薄层层析硅胶预制板 $\text{GF}_{254}(20\times 10\text{cm})$ 。样品经冷冻干燥 ,甲醇萃取后点样 ,以氯仿 :甲醇(3:2)为展开剂展开 ,喷以 1%2 ,4-二硝基苯肼的 3mol/L H_2SO_4 溶液 ,吹热风使毒素呈桔红色 ,采用标准毒素作对照。通过与对照比较判断毒素有无消失。

1.8.2 MON 离子对高压液相色谱法(Ion-pair HPLC)定量分析 :采用 C18 反相柱 ,柱长 15cm 柱内径 4.6mm。分析条件为 :流速 1.0mL/min ,流动相 :甲醇-0.2% 四丁基溴化铵水溶液(15:85)。检测波长 229nm 纸速 1.0mm/min 衰减 2^3 ,进样量 $10\mu\text{L}$ 。以标准纯毒素制作 MON 浓度-峰面积标准曲线。每批待测样品在 HPLC 法分析前先用标准毒素确定 MON 的保留时间。样品经离心弃细胞后根据实际浓度稀释使含量在线性检测限内 ,根据峰面积值对照标准曲线计算毒素浓度 ,并乘以稀释倍数即为样品中 MON 含量。

2 实验结果

2.1 降解菌的筛选

采用微量富集培养筛选法 ,从黑龙江省镜泊湖附近的草甸土中筛选到一株降解菌 ,编号为 Y21-2。该菌株分别在含 $500\mu\text{g/mL}$ MON 的 MA 毒素培养液及基础培养液中 30°C 摇床培养 ,并以不接种的两种毒素培养液为空白对照 ,培养 24h 后取样经 TLC 定性分析 ,结果表明 :与不接种的毒素培养液相比 ,在两种培养液中 Y21-2 菌株 24h 后 MON 完全消失 ,从而初步证明 Y21-2 菌株具有降解 MON 的能力。以 White 培养液进一步证明 ,Y21-2 菌株能以 MON 作为唯一碳源和能源生长。

2.2 降解菌 Y21-2 的初步鉴定

Y21-2 菌株为革兰氏阴性微小杆状细胞 ,电镜下观察其有 1~2 根极生或亚极生鞭毛 (图 1) 。在普通肉汤琼脂平板上菌落高耸、全缘、湿润、半透明、浅黄色。在 King 's 培养

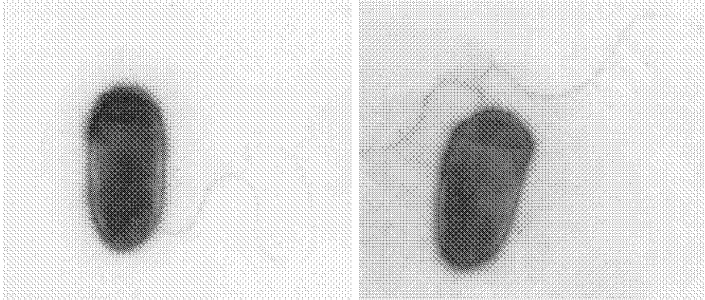


图 1 Y21-2 菌株鞭毛染色电镜观察($\times 15\,000$)

Fig.1 Flagella electrophotography of Y21-2 strain($\times 15\,000$)

基上不产生任何荧光及非荧光色素,氧化酶、过氧化氢酶阳性,不能进行反硝化作用,精氨酸双水解酶阴性,不能从蔗糖生成果聚糖,在乳糖培养基上不产生 3-酮基乳糖,能较为广泛地利用碳水化合物、有机酸、氨基酸等作为唯一碳源和能源生长,氧化型发酵利用葡萄糖。其 G + C mol% 含量为 49.3% (热变性温度法)。经 16S rDNA 测序并比较同源性后,依据 rDNA 同源性在系统发育中的分类原则并结合表型特征,参考《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》第九版,最终将 Y21-2 菌株归类于 Proteobacteria, α -亚群(α -subdivision)根瘤菌科(Rhizobiaceae)苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)。

2.3 Y21-2 菌株降解 MON 能力的测定

Y21-2 菌株在以 MON 为唯一碳源和能源的基础培养液中培养时,24h 内 500 μ g/mL-MON 基本被完全降解,毒素的消耗伴随着菌数的增长(图 2)。前期菌数从 10⁷ 增加至 10¹⁰,后期活菌数急剧下降,分析原因可能是因为 MON 的分子量仅为 98,由它可提供给菌体生长的碳源有限所致。

2.4 静息细胞试验

高浓度静息细胞(*OD*₆₀₀ = 20)在 4h 内就能将 500 μ g/mL 浓度的 MON 基本代谢完毕(图 3)。说明 Y21-2 菌株细胞内确实存在能利用 MON 的酶系。

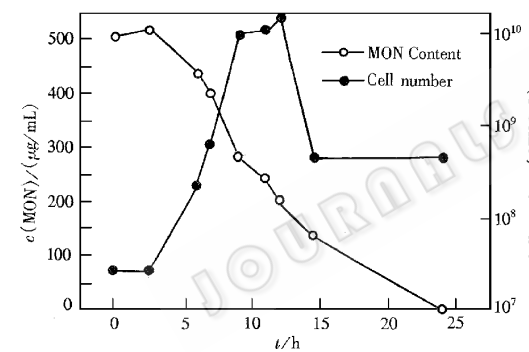


图 2 Y21-2 菌株在 MON 基础培养液中毒素消耗与菌株生长曲线

Fig.2 Time courses of MON concentration and cell concentration

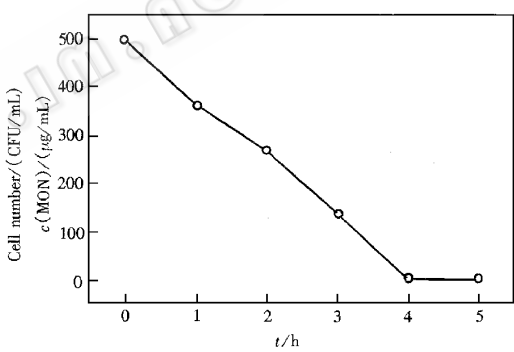


图 3 Y21-2 静息细胞代谢 MON 曲线
Fig.3 MON degradation of Y21-2 resting cell suspensions

3 讨论

筛选降解串珠镰刀菌素的细胞目前在国内和国际上尚属首次,本实验设计了针对真菌毒素降解菌筛选的微量富集培养筛选法,能最大限度地节约毒素用量。实践证明该方法是经济有效的。实验发现,该降解菌 Y21-2 菌株在分类学上的地位也比较特殊,根据传统分类方法及现代分子生物学技术将其归类为 1988 年新定的根瘤菌科的苍白杆菌属^[6],但不属于该属目前已知的唯一一种——人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*),其具体的分类地位还需与模式种进行 DNA 杂交,根据同源性作进一步分析。

已证实 Y21-2 菌株能以 MON 为唯一碳源和能源生长,并对其降解 MON 的基本特性作了初步研究,为今后降解酶的提及其基因克隆打下基础。

致谢 承蒙德国 University of Hohenheim 的 Dr. Petr Karlovsky 为本实验提供宝贵建议, 特此感谢。

参 考 文 献

- [1] Cole R J , Kirksey J W , Cutler H G , *et al.* , *Science* , 1973 , **179** : 1324.
- [2] Rabie C J , Lubben A , Loauw A , *et al.* , *J Agric Food Chem* , 1978 , **26** : 375 ~ 379.
- [3] 徐厚恩 , 张 铎 . 卫生毒理学基础 . 北京 : 北京医科大学出版社 , 1991.
- [4] Allen NK , Burmeister H R , Weaver G A , *et al.* , *Poult Sci* , 1981 , **60** (7) : 1415 ~ 1417.
- [5] Kriek N P J , Marasas W F O , Steyn P S , *et al.* , *Food Cosmet Toxicol* , 1977 , **15** (6) : 579 ~ 587.
- [6] 李季伦 , 史 艇 , 章 红 . 医学研究通讯 . 1986 , **15** (10) : 306.
- [7] 刘兴玠 . 卫生研究 1996 , **25** : 151 ~ 155.
- [8] Aro A , Kumpulainen J , Alftan G , *et al.* , *Biol Trace Elem Res* , 1994 , **40** : 277 ~ 285.
- [9] Cenac A , Simonoff M , Moretto P , *et al.* , *Int J Cardiol* , 1992 , **36** : 57 ~ 59.
- [10] 章 红 , 李季伦 . 微生物学报 , 1994 , **33A** : 119 ~ 124.
- [11] 章 红 , 李季伦 . 微生物学报 , 1989 , **29** (2) : 93 ~ 100.
- [12] White L O . *J Gen Microbiol* , 1972 , **72** : 565 ~ 574.
- [13] Pagen J D , Child J J , Scowcroft W R , *et al.* , *Nature* , 1975 , **256** : 406 ~ 407.
- [14] Paabo S , Wilson A C , *Nature* , 1988 , **334** : 387 ~ 388.
- [15] Altschul S F , Madden T L , Schaffer A A , *et al.* , *Nucleic Acids Res* , 1997 , **25** : 3389 ~ 3402.
- [16] Holmes B , Popoff M , Kiredjian M , *et al.* , *Int J Syst Bacteriol* , 1988 , **38** : 406 ~ 416.

ISOLATION OF MONILIFORMIN-DEGRADING BACTERIUM *OCHROBACTRUM* SP. AND ANALYSIS OF ITS FUNCTIONAL PROPERTIES

Chen Weiqin Zhang Hong Li Jilun

(College of Biological Sciences , China Agricultural University , Beijing 100094)

Abstract : A moniliformin(MON)-degrading bacterium strain , named as Y21-2 , was isolated from the mycotoxin-contaminated soil from Heilongjiang Province by the enrichment microculture technique. This strain can grow with MON as its sole carbon and energy source. In the minimal medium with 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MON , the number of cells increased from 10^7 to 10^{10} . Traditional taxonomy assays of its G + C content and 16S rDNA sequence homology identified Y21-2 as *Rhizobiaceae* , *Ochrobactrum* sp. Resting cell suspensions prepared from induced Y21-2 can degrade MON with great speed , which also suggested the existence of enzymes committed to MON degradation in the cell.

Key words : Moniliformin , Degradation , *Ochrobactrum* sp.