

# 放綫菌 (*Actinomyces* sp. A) 對一些病原 細菌的拮抗作用的初步實驗報告\*

張 素 雅

(中山大學生物系植物生理教研組)

由放綫菌屬分離出來的抗生素很多,有鏈黴素、金黴素、氯黴素、土黴素、碳黴素及生黴素等等。除這些在臨床上有廣大應用前途的抗生素以外,還有一些如紫放綫菌素、放綫菌酮、新黴素、紫黴素、長孢放綫菌素、石蕊黴素及小單孢菌素等,也被不同程度地利用着或者正在實驗中。一般來說,放綫菌屬所產生的抗生素具有強大的抗菌能力。1953 年 4 月,王維聲從南昌市郊區水田土壤中分離出一種放綫菌。這種放綫菌經中國科學院菌種保藏委員會鑑定為放綫菌屬;因種名尚未確定,所以暫命名為 *Actinomyces* sp. A。*Actinomyces* sp. A 已被證實對甘藷軟腐病及柑桔青黴病等在平板培養中及栽培作物上都表現有拮抗現象。本實驗乃用這種放綫菌與一些致病性和非致病性細菌做拮抗實驗,以探求其在醫學上應用的可能性與價值。

放綫菌 (*Actinomyces* sp. A) 的培養特性:最適合生長的溫度是 30°C, pH 是 5.8。在液體培養基表面上生長迅速,形成褐色素。菌絲分為白色氣生菌絲與淡褐色營養菌絲二部分,不形成分生孢子。菌絲體可斷裂成桿狀。用液體馬鈴薯培養基比用固體馬鈴薯培養基生長良好,同時產生抗生素的能力也強;特別是用表面積大的錐瓶培養時,效果更好。用液體培養基培養 3—4 天即可生長良好;用固體培養基需要 5—7 天才能得到同樣的結果。如果將它沉沒在培養液內培養,則生長不好,同時不形成氣生菌絲或形成很少,產生抗生素的能力也低。在用發芽的馬鈴薯製備的培養基上培養,生長不好,色素產生快而多,且所形成的色素由褐色變為近似黑色。

## 實 驗 材 料

(一) 放綫菌 (*Actinomyces* sp. A): 實驗前,將放綫菌用錐瓶培養法培養在馬鈴薯液體培養基上,保持 30°C, 3 天後生長旺盛時取出備用。

(二) 菌種: 用金黃色葡萄球菌、白色葡萄球菌、檸檬色葡萄球菌、溶血性鏈球菌、枯草桿菌、傷寒桿菌、福氏痢疾桿菌、大腸桿菌、變形桿菌、產氣桿菌、綠膿桿菌及卡他雙球菌。這些菌種除溶血性鏈球菌是保存在血瓊脂斜面上外,其他菌種都保存在普通瓊脂斜面上。實驗前,在 37°C 恆溫箱內培養 24 小時,取出備用。

(三) 培養基:

1957 年 9 月 6 日收到。

\* 本文承于志忱教授指導,傅家瑞先生及植物生理教研組諸位之幫助,特此致謝。

1. 普通瓊脂培養基:

蛋白胨(純)	10 克	瓊脂	20 克
牛肉浸膏	3 克	自來水	1,000 毫升
氯化鈉	5 克	調節 pH 至 7.6	
磷酸氫二鉀	1 克		

2. 馬鈴薯液體培養基:

將新鮮馬鈴薯去皮後稱取 500 克, 加水 1,000 毫升, 煮沸半小時後用紗布加壓過濾, 取濾液加水至 1,000 毫升, 然後加入砂糖 20 克, 待砂糖溶解後, 糾正 pH 至 5.6—5.8。取 150—200 毫升的錐瓶 20 個, 每個裝 50 毫升備用。

3. 鑑定用的培養基:

蛋白胨(純)	10 克	自來水	1,000 毫升
牛肉浸膏	5 克	調節 pH 至 7.8—8.0	
氯化鈉	2.5 克		

實驗方法與結果

(一) 放綫菌 (*Actinomyces* sp. A) 的拮抗效能測定

由於馬鈴薯瓊脂培養基不宜於所用的細菌的生長, 所以實驗是在普通瓊脂平板上進行的。作法是先將經過 24 小時培養好的細菌用劃綫方法接種在瓊脂平板的表面, 使整個面舖滿細菌; 然後用白金耳挑取培養好之放綫菌菌絲一小塊, 接種於瓊脂平板的中央, 將接種好的瓊脂平板培養於 37°C 恆溫箱內, 24 小時後取出觀察結果, 以毫米計測量放綫菌周圍細菌不生長區(拮抗圈)的大小, 將所得的結果列入表 1。

表 1 放綫菌 (*Actinomyces* sp. A) 對 12 種病原細菌的拮抗作用

菌 名	不生長區直徑 (毫米)	備 註
金黃色葡萄球菌	17—23	不生長區邊緣不明顯
檸檬色葡萄球菌	20—29	
白色葡萄球菌	30—33	
溶血性鏈球菌	13—18	
枯草桿菌	25—29	
卡他雙球菌	15—20	不生長區邊緣不明顯
綠膿桿菌	—	
大腸桿菌	15—20	
產氣桿菌	13—15	
變形桿菌	15—23	
傷寒桿菌	12—18	
福氏痢疾桿菌	13—17	

由表 1 中所列放綫菌周圍細菌不生長區的大小, 可看出放綫菌所產生的抗生素對革蘭氏陽性細菌的作用較強, 對革蘭氏陰性細菌的作用較弱, 對綠膿桿菌沒有作用。在靠近不生長區邊緣的細菌生長得比較旺盛, 色素也較深。這說明 *Actinomyces* sp. A 產生

的抗生素與其他已知的抗生素一樣，在一定濃度時有抗菌（抑菌、殺菌或溶菌）作用，而低於有效濃度的微量抗生素反能刺激細菌的生長。

在實驗過程中，由不生長區內挑取材料做塗片，染色，作鏡檢。由於放綫菌抗生素的影響，細菌的形態染色發生了改變。菌體膨大，同時有解體現象。菌體染色不均勻。原革蘭氏染色陽性的細菌染成了革蘭氏陰性。

## （二）低溫處理對拮抗作用的影響

改變抗生素微生物生長的條件，可以提高抗生素的產量。本試驗試用低溫處理的方法得到了良好的效果。將細菌和放綫菌如前法接種於瓊脂平板上，然後放在 0—8°C 低溫下 3 天，將另一組同樣接種好的培養物放在 22—23°C 室溫下 3 天，以作對照。將上述分別處理過的兩組培養物一齊放在 37°C 恆溫箱內培養 24 小時，然後觀察結果（表 2）。

表 2 經過低溫處理後放綫菌 (*Actinomyces* sp. A) 對 12 種病原細菌的拮抗作用

菌 名	0—8°C 低溫處理 3 天後放入 37°C 恆溫箱內培養 24 小時後之不生長期直徑 (毫米)	22—23°C 室溫處理 3 天後放入 37°C 恆溫箱內培養 24 小時後之不生長期直徑 (毫米)
金黃色葡萄球菌	33—40	16—21
檸檬色葡萄球菌	41—43	20—25
白色葡萄球菌	36—50	24—26
溶血性鏈球菌	40—42	11—13
枯草桿菌	44—48	23—25
卡他雙球菌	34—41	15—20
綠膿桿菌	—	—
大腸桿菌	32—35	15—20
產氣桿菌	25—27	12—16
變形桿菌	30—34	15—18
傷寒桿菌	20—32	12—17
福氏痢疾桿菌	18—24	14—16

從表 2 所列數值可看到經過低溫處理後放綫菌的拮抗作用除對綠膿桿菌仍然無效外，其拮抗圈直徑的大小在鏈球菌增加了 2½ 倍；福氏痢疾桿菌增加了 1/2 倍，其他都增加了 1 倍左右。若以平板上拮抗圈的面積代表其拮抗效能，則其拮抗效能提高了 4 倍左右。

## （三）抗菌效能的鑑定

以一定量的放綫菌培養液與市售鏈黴素製備的水溶液做對照實驗，以求出放綫菌所產生的抗生素的相對抗菌效能。取華氏試管 14 支，分做兩列，每列除第一管外，其他 6 管（兩列共 12 管）各放入鑑定用之培養基 0.5 毫升。將依前法培養過 3 天的放綫菌馬鈴薯液體培養基濾液（用滅菌棉花過濾）以鑑定用培養基作 1:5 稀釋。取此稀釋液 0.5 毫升放入第一列小試管的第一管，再取 0.5 毫升加入第二管，混合後由第二管取出 0.5 毫升加入第三管，依二倍逐級稀釋法逐管稀釋之，最後自第七管棄去 0.5 毫升。另取市售鏈黴素，用鑑定用培養基製備成每毫升含 20 微克的溶液。取此種鏈黴素溶液 0.5 毫升放入第二列試管的第一管，再取 0.5 毫升加入第二管，由第二管至第七管依上述二倍逐級稀釋法稀

釋之，最後自第七管棄去 0.5 毫升。然後取經過 24 小時 37°C 恆溫箱培養的枯草桿菌牛肉湯液體培養，用滅菌玻璃珠打碎菌膜，使成為較均勻的懸浮液。於所有兩列的各試管內接種此種枯草桿菌懸浮液一白金耳，培養在 37°C 恆溫箱內 24 小時，觀察結果。以無菌生長的最後一管為終點，即是足以抑制枯草桿菌生長的最高稀釋度。將結果記錄於表 3。

表 3 放綫菌抗生素抗菌效能的鑑定

抗 生 素 \ 管 號	1	2	3	4	5	6	7
1:5 放綫菌培養濾液	-	-	+	+	+	+	+
20 微克/毫升鏈黴素稀釋液	-	-	-	-	+	+	+

“+”表示細菌生長；“-”表示細菌不生長。

表 3 內 1:5 稀釋的放綫菌培養濾液的終點為第二管，鏈黴素稀釋液的終點為第四管，所以 1:5 稀釋的放綫菌液體培養濾液的抗菌效能相當於 20 微克/毫升鏈黴素溶液的 1/4；即每毫升放綫菌培養濾液的抗菌效能相當於 25 微克/毫升鏈黴素稀釋液的抗菌效能。

將依前法經過培養 3 天的放綫菌馬鈴薯液體培養放在 0—8°C 的低溫下處理 3 天，取出，過濾，取其濾液作 1:10 稀釋，同樣以二倍逐級稀釋法求得放綫菌經過低溫處理後的抗菌效能，將結果列入表 4。

表 4 經低溫處理後放綫菌抗生素抗菌效能的鑑定

抗 生 素 \ 管 號	1	2	3	4	5	6	7
1:10 放綫菌培養濾液	-	-	-	+	+	+	+
20 微克/毫升鏈黴素稀釋液	-	-	-	-	+	+	+

由表 4 所得結果，可以看出經過低溫處理後 1:10 稀釋的放綫菌液體培養濾液的抗菌效能相當於 20 微克/毫升鏈黴素溶液的 1/2；也即經過低溫處理後每毫升放綫菌培養濾液的抗菌效能相當於 100 微克/毫升鏈黴素溶液的抗菌效能。與上述的 25 微克/毫升的數值相比較，經過低溫處理後放綫菌培養濾液的抗菌效能提高了 4 倍。

## 結 論

(一) *Actinomyces* sp. A 最適合生長的溫度為 30°C；pH 5.8。在液體的馬鈴薯培養基表面上培養 3—4 天即可生長良好；在固體的馬鈴薯培養基上則需要培養 5—7 天才能得到同樣的結果。

(二) *Actinomyces* sp. A 所產生的抗生素以本實驗所用的 12 種細菌來說，對革蘭氏陽性細菌作用較強；對革蘭氏陰性細菌作用較弱；對綠膿桿菌沒有作用。

(三) *Actinomyces* sp. A 的馬鈴薯液體培養濾液對枯草桿菌的拮抗作用相當於 25 微克/毫升濃度的鏈黴素溶液。低溫處理可使 *Actinomyces* sp. A 產生抗生素的能力提高到 4 倍。

## 參考文獻

- [1] 王維聲：放綫菌對於植物病原細菌拮抗作用的初步實驗報告，微生物學報，2: 161, 1954.
- [2] 馬譽激：抗生素論文集，1954.
- [3] 馬譽激：抗生素，1955.
- [4] 福建師範學院化學系：抗生性放綫菌的研究，土壤微生物學通訊，(5、6)，1955.
- [5] 戴自英：實用抗生素學，1952.
- [6] 奧爾賓，A. II.：青黴菌屬的土壤真菌對植物致病細菌的拮抗作用；植物病理學譯報，4:250, 1955.
- [7] 傑米霍夫斯基，E. H.：細菌性質定向變異的研究方法，微生物學譯報，1:272, 1954.
- [8] 貝得魯曉娃，H. H.：放綫菌對植物病原真菌相剋性能的研究，植物病理學譯報，1:82, 1955.
- [9] 庫拉吉娜，P. B.：白喉桿菌在抗生素影響下的變異性，微生物學譯報，3 (1):58, 1956.

## A PRELIMINARY REPORT ON THE ANTAGONISM OF *ACTINOMYCES* SP. A TO CERTAIN COMMON BACTERIA

CHANG SHU-YEA

(Department of Plant Physiology, Chunshaw University, Canton)

A species of actinomyces was preliminarily isolated by Wang Wei-seng from the soil in the rice-field in the vicinity of Nanchang in 1953. It has been temporarily designated as *Actinomyces* sp. A by the Peking Laboratory of Microbiology of Academia Sinica. It grows readily on the surface of potato infusion at 30°C, and pH 5.8.

The effect of the antagonism of *Actinomyces* sp. A to 12 common micro-organisms are presented. They are *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus citreus*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus hemolyticus*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria catarrhalis*, *Pseudomonas pyocyaneus*, *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhosa* and *Shigella flexneri*. The effect of the antagonism is strong to Gram-positive organisms, comparatively weak to Gram-negative organisms, but none to *Pseudomonas pyocyaneus*.

The antagonistic action of the filtrate of the three-days culture of potato infusion of *Actinomyces* sp. A to *Bacillus subtilis* is equal to that of the solution of streptomycin with the concentration of 25 micrograms per cc.

The value of increasing the antibiotics production by means of cold treatment of the culture of the antibiotics-producing organisms is demonstrated. By use of this method the strength of the antagonism of the three-days culture of potato infusion of *Actinomyces* sp. A against these micro-organisms is increased four times.