

庆丰链霉菌细菌素*

余茂效

魏芸斋 张仪裳

(中国科学院微生物研究所, 北京) (中国科学院四川生物研究所, 成都)

本文报道了庆丰链霉菌斜面培养物上出现的空斑, 排除了由于噬菌体污染而引致的可能性; 发现和证实可不经诱导而自发产生的细菌素物质, 并能对该菌本身产生抑制生长; 斜面上出现的空斑与这种细菌素产生的关系进行了探讨; 对于放线菌中确定细菌素的问题进行了讨论。

庆丰链霉菌 (*Streptomyces qingfengmyceticus*)^[1,2] 作为一种有效的农用抗菌素生产菌投入生产以来, 在菌种斜面培养物上, 陆续发现一种直径从针尖到 0.8 毫米左右, 中空下陷的斑。据初步了解, 使用这种斜面菌种生产抗菌素的产量较一般正常斜面的产量降低约 20—30%, 经过常规分析和检查, 排除了污染噬菌体而造成这一现象的可能, 而有现象表明这与其本身自发产生并能抑制其部分细胞生长的细菌素物质有一定相关。

材料和方法

(一) 材料

1. 菌株: (1) 庆丰链霉菌 Q: 一株生产用菌, 目前尚未发现在其斜面培养物上出现空斑。

(2) 庆丰链霉菌 Q₁: 斜面培养物上有时可见到针尖大小的空斑。

(3) 庆丰链霉菌 Q₂: 斜面培养物上可出现数量不多, 直径 0.5—0.8 毫米的空斑, 随着培养时间的延长, 空斑可被白色气生菌丝所充满。

(4) 庆丰链霉菌 Q₃: 斜面培养物上空斑出现较多, 其大小介于前二者之间, 这四株菌出自同一菌株经分离而得。

(5) 340 株放线菌, 均由中国科学院成都生物研究所和微生物研究所提供。

2. 培养基和培养条件: (1) 黄豆粉培养基

(%): 黄豆粉 1.0 (煮沸 10 分钟后过滤取上清液), 葡萄糖 1.0, 蛋白胨 0.3, 氯化钠 0.2, 碳酸钙 0.2, pH 7.0—7.2。

(2) 马铃薯葡萄糖培养基 (%): 马铃薯 20 (煮沸 20 分钟后取汁液), 葡萄糖 1.0, pH 7.0。

(3) 高氏 1 号培养基。

(4) 麦麸培养基 (%): 麸皮 3.6, (NH₄)₂HPO₄ 0.03, K₂HPO₄ 0.02, MgSO₄ · 7H₂O 0.01, 琼脂 2.0, 自然 pH。以上培养基用作底层时加琼脂 2%, 作上层时为 1%。液体培养时, 每 500 毫升装 50 毫升, 3000 毫升三角瓶装 500 毫升。

培养温度为 28—30℃, 迴旋式摇床, 每分钟转速 198 次 (500 毫升瓶) 和 180 次 (3000 毫升瓶), 平皿一般经培养 36 小时观察结果。

(二) 测定方法

1. 参照 Fredericq^[3] 的方法, 用二倍或十倍稀释法, 以 0.1%、pH 7.0 蛋白胨液或无菌水稀释被测样品。取 0.2 毫升指示菌孢子悬液 (10⁶—10⁷ 个/毫升) 与融化后冷却至 50℃ 的上层马铃薯葡萄糖培养基 3 毫升混合, 倾注入已凝固的高氏 1 号底层平板上, 铺平凝固后, 将测样依顺时针方向按每样 10 微升点滴, 每皿以 8 个样为宜。如需样品速干, 可在平皿中央放置一直径为 2 厘米, 高为 0.5 厘米灭菌的小皿, 中间置适量 P₂O₅ 吸湿,

本文于 1980 年 3 月 10 日收到。

* 作者感谢 Tobias Kieser 博士对本文工作进行有益的讨论。

一般在数小时内可使样品被吸收完毕。在 28℃ 下培养 36 小时后检查结果,以抑制指示菌生长最终的样液稀释倍数折算为样品的滴度,即任意单位(AU/毫升)^[4,11]表示。

2. 庆丰霉素抑制效果测定:将直径为 0.8 厘米的灭菌滤纸片放在混有被测定菌悬液的上层琼脂上,滴入 50 微升不同稀释度的庆丰霉素^[11](由中国科学院上海植物生理研究所提供所制备的纯品)溶液,任其吸收,经 2 天培养后观察结果。

3. 诱导试验:利用丝裂霉素 C 或紫外线作为诱导因子,分别按下述方法进行。取在黄豆粉培养基中生长 24 小时的 Q₂ 菌悬液,加入终浓度达 0.1—5 微克/毫升的丝裂霉素 C (Kyowa Hakko Kogyo Co.),振荡培养 4、8 和 12 小时,在室温下过夜,测定细菌素的活性。利用紫外线诱导时,将盛有菌悬液的小皿,液层不超过 2 毫米后,距 15 瓦紫外灯 30 厘米,在磁力搅拌下照射 1.5 分钟,继续振荡培养 3 小时,测定活性。在平板上处理时,将庆丰链霉菌孢子悬液 50 微升滴在黄豆粉培养基平板上,培养过夜。稍现生长后,在紫外线下照射 1.5 分钟,继续培养 3 小时。将平皿反置在加入氯仿的血盖上,30 分钟后,然后驱散剩余的氯仿,按测定方法铺以含指示菌悬液的上层琼脂,培养后观察结果。

4. 细菌素的制备:将庆丰链霉菌 Q₂ 斜面的孢子洗下,接入液体培养基中,培养 2 天,经 5,000 转/分离心,取上清液,可浓缩以提高滴度。

5. 电镜观察:取庆丰链霉菌 Q₂ 培养的上清浓缩液或平板上的抑制圈浸出液,经 2% 磷酸铀负染后,悬滴于复有火棉胶的铜网上,空气中干燥,在日立 HU-A 电子显微镜下观察¹⁾。

结 果

庆丰链霉菌斜面上出现一种空斑,直径从针尖状到 0.8 毫米左右,反向对光观察时易于观察到。经过常规噬菌体测定方法的检查,没有发现噬菌斑,经过诱导后也没有出现噬菌斑。取以上各种培养物材料制片,在电镜下观察多次,未发现完整噬菌体颗粒。

利用与庆丰链霉菌交叉划线和菌悬液

点滴测定,从所收集和保藏的 340 株放线菌中筛选敏感指示菌,发现受到显著抑菌者有绿色产色链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 192, 球团产色链霉菌 (*S. glomerochromogenes*) 18, 微白链霉菌 (*S. albidus*) 325²⁾ 和金色横隔分裂链霉菌 (*S. aureosegmentosus*) AS 4.515。但欲利用作为指示菌,还必需排除这种抑菌现象是否由庆丰霉素抗菌素本身所致。为此利用不同浓度庆丰霉素纯品对初选菌株的影响进行测定,表 1 说明 AS 4.515 和 325 对抗菌素敏感,不能作为指示菌,绿色产色链霉菌 192 作为指示菌较为理想。表 2 各种放线菌种经测定后,确定为非敏感菌。

庆丰链霉菌经过紫外线诱导或不经诱导,在有指示菌(192)的平板上均可出现明显的抑菌现象。随着培养时间的延长,抑菌圈有一定变化,36 小时可趋向稳定,其直径可达 15 毫米,若包括晕圈在内,可达 24 毫米(图版 I-1a、1b)。庆丰链霉菌 Q₂ 液体培养 24—36 小时后,可以出现大量细菌素物质(另文报道),利用丝裂霉素 C 或紫外线,在不同剂量诱导下,并未发现细菌素有所增加。其它几株包括庆丰链霉菌 Q₁ 和 Q₂ 基本上表现相似,没有明显的差异。

庆丰链霉菌 Q 在黄豆粉培养基中生长良好,42 小时培养的发醇液外观呈灰乳白色、粘稠、可见块状菌丝体,而加入 10⁴ AU/毫升细菌素时,发醇液呈浅黄色、变稀、未见块状菌丝体,图版 I-2—6 展示 72 小时内的生长过程,5 小时孢子萌发(2),当加入细菌素时,萌发不显著(2'),从 10 小时后菌丝形成分枝(3),而(3')中未能见到,从 19—72 小时,菌丝分布成网状,相当稠密

1) 中国科学院生物物理研究所电镜室,四川医学院电镜室协助观察,特此致谢。

2) 这三株菌特请阎述初、邢桂香和张国伟同志鉴定,特此致谢。

表 1 不同浓度庆丰霉素抑制生长的影响

庆丰霉素 (单位/毫升)	绿色产色链霉菌 192	球团产色链霉菌 18	金色横隔分裂链霉菌 AS4.515	微白链霉菌 325
0	+	+	+	+
500	+	+	—	—
1,000	+	+	—	—
3,000	+	+	—	—
5,000	+	+	—	—
10,000	+	+	—	—

*“+”生长正常;“—”抑制生长。

表 2 经过测定后的非敏感菌株

菌 名	菌 株
<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	AS 4.892, AS 4.257
<i>Streptomyces biverticillatus</i>	AS 4.930
<i>Streptomyces hydroviolascens</i>	AS 4.1004
<i>Streptomyces aureolongisporus</i>	AS 4.914
<i>Streptomyces olivaceus</i>	AS 4.943
<i>Streptomyces odorifer</i>	AS 4.942
<i>Streptomyces venezuelae</i>	AS 4.223
<i>Streptomyces lilacinoverticillatus</i>	AS 4.923
<i>Streptomyces ahydroscopicus</i>	AS 4.938, AS 4.939
<i>Streptomyces globisporus</i>	AS 4.92, AS 4.744
<i>Streptomyces fulvirectus</i>	AS 4.908
<i>Streptomyces chromogens</i>	AS 4.919
<i>Streptomyces lavendulae</i>	AS 4.913
<i>Streptomyces melanochromogenes</i>	AS 4.186
<i>Streptomyces coelicolor</i>	AS 4.461
<i>Streptomyces fradiae</i>	AS 4.685
<i>Streptomyces aureus</i>	AS 4.896, AS 4.910, AS 4.909
<i>Streptomyces griseus</i>	AS 4.181
<i>Streptomyces gramineus var. rectus</i>	AS 4.512
<i>Streptomyces flaveolus var. rectus</i>	AS 4.39, AS 4.440, AS 4.442, AS 4.517
<i>Streptomyces gougerotii</i>	AS 4.26
<i>Streptomyces aureosegmentosus</i>	AS 4.514, AS 4.515
<i>Streptomyces flavopilosus</i>	AS 4.635
<i>Streptomyces glomeroflavescens</i>	AS 4.424
<i>Streptomyces aurofaciens</i>	AS 4.184, AS 4.568
<i>Streptomyces microflavus</i>	AS 4.891
<i>Streptomyces microaureus</i>	AS 4.889
<i>Streptomyces rimosus</i>	AS 4.72
<i>Nocardia mediterranei</i>	AS 4.915, AS 4.918

(4—6), 而相应的 (4'—6) 中出现大量断裂的菌丝, 说明菌体生长受到严重阻抑, 这种情况在平板上可以直接观察到 (图版

I-7—11)。

为了肯定和确证庆丰链霉菌对其本身所产的细菌素物质是否敏感, 我们将庆丰

表 3 单株培养上清液对本株抑制程度的表现

出发菌株	分离单菌数	抑制菌数	中间型菌数	不抑制菌数
庆丰链霉菌 Q ₁	58	4	24	30
庆丰链霉菌 Q ₂	56	5	20	31
庆丰链霉菌 Q ₃	59	2	27	30
合 计	173	6.4%	41.0%	52.6%

表 4 单菌培养上清液对 Q₃-13 的抑制程度

出发菌株	分离单菌数	抑制菌数	中间型菌数	不抑制菌数
庆丰链霉菌 Q ₁	55	1	12	42
庆丰链霉菌 Q ₂	54	22	14	18
庆丰链霉菌 Q ₃	76	4	17	55
庆丰链霉菌 Q	74	7	17	50
合 计	259	13.0%	23.0%	64.0%

表 5 单菌培养上清液对 Q₃-58 的抑制程度

出发菌株	分离单菌数	抑制菌数	中间型菌数	不抑制菌数
庆丰链霉菌 Q ₁	55	1	10	45
庆丰链霉菌 Q ₂	54	18	18	18
庆丰链霉菌 Q ₃	76	6	17	53
庆丰链霉菌 Q	67	1	3	63
合 计	252	10.3%	19.0%	71.0%

链霉菌 Q₁、Q₂ 和 Q₃ 进行单菌落分离,分别培养制备上清液,对本株测定其敏感株(表 3),结果表明有三种类型,其情况基本相似。从 Q₃ 分得对本株培养上清液敏感的 Q₃-13 和不敏感的 Q₃-58 为代表,检查一些分离的单菌培养上清液对它们的抑制影响(表 4 和表 5)。

以上结果表明,庆丰链霉菌菌株,不论其斜面上出现空斑多少,在培养过程中都能产生有活性的细菌素;庆丰链霉菌中确实存在一些菌株对其本身所产的细菌素敏感,也有一些对异株(表 4、5)所产生有活性的细菌素敏感,但大多数(52—71%)单菌对细菌素表现不敏感,是否取决于细菌素数量达到一定程度时才能使其表现敏感,尚不清楚。然而从敏感程度看,是具有显著的差异,图版 I-2—6 和 I-7—11 直接

说明这种现象。

分别从庆丰链霉菌 Q₂ 和 Q₃ 各选 5 株单菌连续传代。在传代中出现产生孢子现象较差时,即移接在麦麸培养基上。经过 20 次传代,分别测定平板上的抑菌圈,均显示其产生活性物质的能力,并能稳定保持。

讨 论

庆丰链霉菌的斜面培养物上出现空斑,这在放线菌中并不是个别现象,我们曾在浅灰链霉菌(*S. griseolus*)、灰色产色链霉菌(*S. griseochromogenes*)、林可霉菌(*S. lincolnensis*)和细黄链霉菌(*S. microflavus*)的斜面或平板培养物上偶尔也可观察到这种现象。Райтштейн^[6]曾经报道龟裂链霉菌(*S. rimosus*)的斜面培养物上出现空斑,

其形状和大小与我们所见的相似, 他们认为可能是由缺陷噬菌体或酶所引致的。我们对上述菌株, 除黄链霉菌外, 通过常规噬菌体检查, 都没有发现噬菌体的存在, 尽管其中有些菌株在生产中曾发生过噬菌体的污染。而庆丰链霉菌经过多次各种检查, 没有发现噬菌体污染。因此, 必需从其它方面来考虑和分析原因。

经初步工作, 庆丰链霉菌出现空斑, 可能与其本身所产生的而又能对其中某些细胞有抑制生长的细菌素有一定关系, 表 3—5 和图版 I-2—11 在不同方面明显地表现了这种关系, 但尚须更进一步分析其直接的相关。

根据试验分析, 看来这种具有生物活性的物质的产生特性和性质, 与一般细菌中产生的细菌素十分相似。在放线菌中, 曾报道维尔琴尼亚链霉菌 (*S. virginiae*) 产生细菌素^[7]。后来 Roelants 和 Naudts 报道该菌能产生一种丝裂霉素 C 可诱导的类似细菌素物质^[8]。Franks, Herbert 和 Ueda 曾报道在溶齿放线菌 (*Actinomyces odontolyticus*) 中, 鉴定了一种具有依赖于温度致死性质的细菌素^[9]。最近 Schurter 等人报道在 (*S. glaucescens*) 中发现一种丝裂霉素 C 不能诱导热不稳定的细菌素^[10], Stevenson 和 Hopwood 曾在天蓝色链霉菌 (*S. coelicolor*) A3(2) 中发现称作天蓝色链霉菌素 (coelicin) 的细菌素 (转引自 Schurter 等, 1979)。我们称庆丰链霉菌产生的细菌素为庆丰链霉菌素 (qingfengcin), 它是一种可以不经紫外线或丝裂霉素 C 诱导而自发产

生的细菌素, 对本株部分细胞具有致死活性。这些特性分别与目前已知的 *S. glaucescens*^[10] 和 *S. virginiae*^[7] 中产细菌素特性和细菌素的性质相同。

目前有关链霉菌产生细菌素和类似细菌素物质的报道尚属鲜见, 但这并不反映链霉菌中产生细菌素数目很少, 主要原因在于区别于通常大分子量的抗菌素的方法有困难。我们在庆丰链霉菌中能筛选到对庆丰霉素不敏感而对庆丰链霉菌素敏感的指示菌, 就能较顺利地地区分出这种细菌素的存在。利用筛选指示菌的方法对于产生多种抗菌素或广谱抗菌素的链霉菌可能会带来困难。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院植物生理研究所微生物室农抗组: 微生物学报, 14(1):42—46, 1974。
- [2] 中国科学院植物生理研究所微生物室农抗组: 微生物学报, 15(2):101—109, 1975。
- [3] Fredericq, P.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 11:7—22, 1957.
- [4] Goebel, W. F. et al.: *J. Exp. Med.*, 103: 577—588, 1956.
- [5] Mayr-Harting, A. et al.: "Methods for Studing Bacteriocins", in "Methods in Microbiology", Vol. 7A, pp. 316—417. J. R. Norris and D. W. Ribbons, eds. 1972, Academic Press, London and New York.
- [6] Раутенштейн, Я. И. и др.: *Микробиология*, 41:1055, 1972.
- [7] Hamon, Y.: *Pathologie-Biologie*, Vol. 13, no. 15—16/17—18, pp. 806—824, 1965.
- [8] Roelants, P. and F. Naudts.: *Antonie van Leeuwenhoek*, 30: 45—53, 1964.
- [9] Franks, C. K. et al.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 12: 41—417, 1977.
- [10] Schurter, W. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 113, 243—253, 1979.

QINGFENGGIN, A BACTERIOCIN-LIKE SUBSTANCE FROM *STREPTOMYCES QINGFENGMYCETICUS*

Yu Maoxiao

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing*)

Wei Yungzai, Zhang Yishang

(*Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica, Chengdu*)

Streptomyces qingfengmyceticus produces a novel antibiotic, Qingfengmycin, which has been effectively used against a number of important plant diseases. On the slant culture of this strain of *Streptomyces*, there are a lot of peck-like flecks whose size ranges from pin-point to 0.8 mm in diameter. Such flecks have also been observed in some other species of *Streptomyces*. A detail discussion on this phenomenon has been given and the possibility of phage contamination of the culture is excluded.

It has been demonstrated that *Streptomyces qingfengmyceticus* excretes qing-

fengcin, a spontaneously produced bacteriocin-like substance, no matter they are grown in liquid or solid media. *Streptomyces viridochromogenes* 192 has been found to be the ideal sensitive indicator strain for the detection of qingfengcin activity. *S. viridochromogenes* 192 is not only sensitive to qingfengcin but also quite resistant to qingfengmycin even at high concentration.

The finding that a small number of *S. qingfengmyceticus* isolates are sensitive to the qingfengcin may explain the appearance of flecks on the slant culture.