

## 一种甲烷短杆菌的克林达霉素抗性突变型

许宝孝 奚明权

(上海技术师范学院, 上海)

在含克林达霉素 10  $\mu\text{g/ml}$  (无乙酸钠)的 Balch 1 号培养基中重复转种后, 从甲烷短杆菌 HX 菌株中选择出稳定的抗克林达霉素的自然突变株。在含克林达霉素的斜面上, 抗性突变株细胞连成长链。在含克林达霉素的滚管中, 抗性菌落的颜色为深灰色。在有和无克林达霉素的培养基中培养 21 天后, 抗性突变株的甲烷产量相差不大。突变株对红霉素和卡那霉素呈交叉抗性。

**关键词** 甲烷短杆菌; 克林达霉素抗性突变株

产甲烷菌是古细菌的一个大亚群<sup>[1,2]</sup>。它们的许多基本生化性质既不同于真细菌, 又不同于真核生物, 对抗生素的抗性就是其中之一<sup>[3-10]</sup>。

利用遗传学技术改良甲烷杆菌、甲烷短杆菌、甲烷八叠球菌、甲烷发菌和甲烷螺菌, 可以提高这些产甲烷菌在厌氧消化过程中的效率<sup>[10]</sup>。稳定的抗生素抗性突变菌株是研究生化和遗传机理的重要工具。筛选产甲烷菌的抗生素抗性突变株不仅可以为经典的突变研究扩展到产甲烷菌中, 为产甲烷菌遗传研究提供合适的遗传标记, 还可以为厌氧消化器或沼气池微生物研究提供有用的标记菌株。

迄今为止, 关于产甲烷菌抗药性突变株研究的报道还不多<sup>[6,10,11]</sup>。目前分离得到的产甲烷菌抗药性突变株均为自然突变株。它们是巴氏甲烷八叠球菌的抗溴乙烷磺酸突变株<sup>[11]</sup>、甲酸甲烷杆菌的抗茴香霉素突变株<sup>[6]</sup>以及甲烷杆菌 FR-2 菌株的抗杆菌肽突变株<sup>[10]</sup>。有关甲烷短杆菌的抗生素抗性突变株还未见有报道。本文首次报道甲烷短杆菌 HX 菌株抗克林达霉素的自然突变株的分离及其形态和生长研究的初

步结果。

## 材料与方 法

### (一) 菌株和培养条件

甲烷短杆菌 HX 菌株分离自上海科学技术协会生物能实验室的沼气池污泥<sup>[12]</sup>。

分离、生长和保存均用 Balch 1 号培养基<sup>[12]</sup>, 只是不加乙酸钠。培养基的配制、分装, 以及培养物的培养和分离均按照改良的 Hungate 氏技术进行<sup>[12, 13-14]</sup>。菌株的生长条件如[12]中所述。

### (二) 突变株分离

先在装有 4.5 ml Balch 1 号固体培养基的厌氧试管中加入终浓度为 5.0 和 10.0  $\mu\text{g/ml}$  的克林达霉素, 接入约  $10^7$  对数生长的菌体, 滚管。置于 39 $^{\circ}\text{C}$  培养。3 星期后分析试管内空间中的甲烷, 选取产甲烷的滚管, 镜检。挑取单菌落, 再滚管, 一直到选出稳定的克林达霉素抗性突变株为止。

### (三) 生长测定

生长情况用甲烷产量表示。所产甲烷用装有氢焰离子化鉴定器的 100 型气相色谱仪 (上海分析仪器厂出品) 检测。测定条件如前所述<sup>[12]</sup>。

### (四) 细胞计数

细胞总数用血球计数板 (上海医用光学仪器厂出品) 计数。成对或丝状细胞算作一个细胞。在

本文于 1986 年 7 月 8 日收到。  
国家自然科学基金委员会资助项目。

装有 4.5 ml 含克林达霉素的 Balch 1 号固体培养基的厌氧试管中接入约  $10^7$  菌体, 滚管。培养 3 星期后计数。重复 2 次。

#### (五) 光学显微镜检查

用 Olympus Vanox AHB-LB-2 型万能显微镜在可见光以及 420 nm 紫外光下进行观察。在显微镜上装上 PM-10-35 AD-1 型照相机显微照相。

#### (六) 最低抑制浓度 (MIC) 测定

在含有下列不同浓度抗生素的 Balch 1 号培养基中接种  $10^7$  左右的细胞: 克林达霉素 40、20、10 和 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 红霉素 1000、500、250 和 125 单位/ml; 卡那霉素 1000、500、250 和 125 单位/ml。39℃ 培养。3 星期后测定甲烷产量和观察荧光。每个处理 2 个重复。

#### (七) 抗生素

本研究所用抗生素来自括号内所列药厂: 克林达霉素 (Upjohn, Kalamazoo, 美国), 红霉素和卡那霉素 (上海第四制药厂, 上海)。

## 结 果

#### (一) 克林达霉素抗性突变株的分离

在含有克林达霉素 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的培养基中滚管, 2 星期左右就长出克林达霉素抗性菌株的菌落 (图 1), 并有甲烷形成。这样重复 3 次即得稳定的克林达霉素抗性

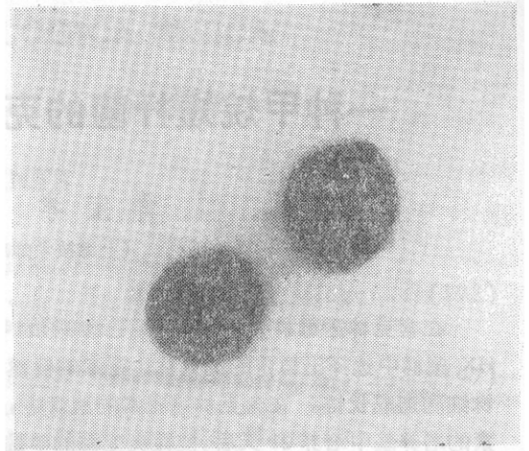


图 1 甲烷短杆菌 HX 菌株的克林达霉素抗性突变株的菌落 (360×)

Fig. 1 Colonies of clindamycin-resistant mutant of *Methanobrevibacter* strain HX

突变株。抗性菌落的出现频率为  $10^{-7}$ — $10^{-8}$ 。

#### (二) 克林达霉素抗性突变株的形态变化

甲烷短杆菌 HX 菌株的细胞为柳叶刀状到卵圆状的短杆菌,  $0.5-0.8 \times 1.0-1.5 \mu\text{m}$ , 单个或成对存在<sup>[2]</sup>。而在含克林达霉素的斜面上长出的细胞却连接成长链, 最长的链可达 20—30  $\mu\text{m}$  (图 2)。滚管菌落的颜色由原来的灰白色加深成为深灰色。



图 2 甲烷短杆菌 HX 菌株抗克林达霉素活细胞的荧光显微照片 (600×)

Fig. 2 Fluorescence photomicrograph of living cells of clindamycin-resistant of *Methanobrevibacter* strain HX

表 1 克林达霉素抗性突变株在有和没有克林达霉素的培养基中生长时的甲烷产量

Table 1 Methane production of clindamycin-resistant mutants growing in medium containing and having no clindamycin

菌株 Strains	甲烷产量 ( $\mu\text{mol}/\text{管}$ ) Methane production ( $\mu\text{mol}/\text{tube}$ )	
	在有克林达霉素的培养基中 In medium containing clindamycin	在无克林达霉素的培养基中 In medium having no clindamycin
突变株-1 Mutant-1	130.0	135.2
突变株-2 Mutant-2	148.8	150.4
突变株-3 Mutant-3	126.0	132.8
突变株-4 Mutant-4	113.6	115.4
亲株 Parent	140.6	212.8

### (三) 克林达霉素的抑制效应

克林达霉素的抑制效应用它的最低抑制浓度 (MIC) 来表示。克林达霉素对产甲烷菌的 MIC 是它使甲烷产量至少下降 10% 的最低浓度。在装有含克林达霉素的培养基的厌氧试管中分别接入甲烷短杆菌 HX 亲株及其抗克林达霉素的突变株。置于 39℃ 培养 3 星期后, 测定甲烷产量。

克林达霉素对 HX 菌株的 MIC 为 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 加入 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的克林达霉素, HX 菌株完全停止甲烷形成。4 株克林达霉素抗性分离物在含克林达霉素 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的培养基中, 甲烷产量分别为: 130.0、148.8、126.0 和 113.6  $\mu\text{mol}/\text{管}$ , 而在含克林达霉素 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的培养基中, 甲烷产量分别下降为: 110.8、125.0、108.6 和 101.4  $\mu\text{mol}/\text{管}$ 。可见克林达霉素对抗性突变株的 MIC 为 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 克林达霉素抗性突变株的 MIC 比它们的亲株高 8 倍。

### (四) 克林达霉素对产甲烷的影响

测验了克林达霉素 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  对突变

株利用甲酸产甲烷的影响。结果表明, 浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的克林达霉素对突变株 1、2、3 和 4 利用甲酸产甲烷无多大影响, 突变株在有和无克林达霉素的情况下, 甲烷产量相差不大 (表 1)。

### (五) 交叉抗性

比较了红霉素和卡那霉素对突变株的抑制效应。红霉素和卡那霉素的 MIC 分别为 500 和 250 单位/ml。但是, 突变株对 250 单位/ml 的红霉素和 125 单位/ml 的卡那霉素呈交叉抗性。

## 讨 论

克林达霉素 (氯林肯霉素) 是林肯霉素族的糖类抗生素。它是林肯霉素的半合成衍生物。林肯霉素族抗生素对革兰氏阳性细菌有较强的抑制作用。在拟杆菌中, 编码可传递的克林达霉素抗性 ( $\text{Cc}^r$ ) 的 R-质粒 pBF4<sup>[15]</sup>, pBFTM 10<sup>[16,17]</sup> 和 pBII 36<sup>[18]</sup> 还赋予对其它林肯酰胺或大环内酯类抗生素的抗性。这些质粒在大小上相差很大, 它们是不同的复制子, 能够通过接合传递给其它拟杆菌。决定  $\text{Cc}^r$  的区段有同源性, 它们似乎具有转座子样的结构<sup>[18-20]</sup>。

细菌对于化学结构和作用机理近似, 或者化学结构不同但作用机理差不多的抗生素常有交叉抗性。克林达霉素与红霉素尽管在结构上有明显差异, 但两者的三维模型有类似之处。位于红霉素中乙基上, 第 2 个碳原子和克拉定糖 5 位上的 3 个甲基, 与克林达霉素中 S-甲基, 第 8 个基团上的甲基以及丙基上的甲基在空间上可能是相对应的。此外, 大环内酯抗生素第 12 位上的羟基与林肯霉素第 2 位上的羟基可能也相对应。而且克林达霉素的作用机理与红霉素也非常相似, 两者都是通过与核糖体 50S 亚基结合而抑制蛋白质合成。所以, 克林达霉素抗性突变株对红霉素有交

叉抗性。

甲酸甲烷杆菌对茴香霉素的抗性系其核糖体 50 S 亚基发生突变变化所致<sup>[6]</sup>。甲烷短杆菌 HX 菌株是否含有赋予克林达霉素抗性的质粒, 它对克林达霉素的抗性是否也是因为其核糖体 50S 亚基发生变化所致, 有待于甲烷短杆菌 HX 菌株中质粒的分离和克林达霉素对野生株及其突变株的核糖体亚基的活性研究来确定。

### 参 考 文 献

- [1] Woese, C. R. et al.: *J. Mol. Evol.*, 11: 245—252, 1978.
- [2] Balch, W. E. et al.: *Microbiol. Rev.*, 43: 260—296, 1979.
- [3] Hilpert, R. et al.: *Zbl. Bakt. Hyg. Abt. 1. Orig.*, C2: 11—20, 1981.
- [4] Pecher, T. and A. Böck: *FEMS Microbiol. Lett.*, 10: 295—297, 1981.
- [5] Elhardt, D. and A. Böck: *Mol. Gen. Genet.*, 188: 128—134, 1982.
- [6] Hummel, H. and A. Böck: *Mol. Gen. Genet.*, 198: 529—533, 1985.
- [7] Di Giambattista, M. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 199: 323—329, 1985.
- [8] Hummel, H. et al.: *System. Appl. Microbiol.*, 6: 125—131, 1985.
- [9] Böck, A. and O. Kandler: Antibiotic sensitivity of archaeobacteria. In: C. R. Woese and R. S. Wolfe (eds.). *The Bacteria VIII*. Academic Press, Inc., New York, pp. 525—544, 1985.
- [10] Harris, J. E. and P. A. Pion: *Arch. Microbiol.*, 143: 151—153, 1985.
- [11] Smith, M. R. and R. A. Mah: *Curr. Microbiol.*, 6: 321—326, 1981.
- [12] 许宝孝等: 微生物学报, 25: 283—288, 1985.
- [13] Bryant, M. P.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 25: 1324—1328, 1972.
- [14] Hungate, R. E.: A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Method of Microbiology*, Vol. 3B. Academic Press, Inc., New York, pp. 117—132, 1969.
- [15] Welch, R. A. and F. L. Macrina: *J. Bacteriol.*, 145: 867—872, 1981.
- [16] Tally, F. P. et al.: *J. Bacteriol.*, 151: 686—691, 1982.
- [17] Guiney, D. G. et al.: *Plasmid*, 11: 268—271, 1984.
- [18] Smith, C. J. and F. L. Macrina: *J. Bacteriol.*, 158: 739—741, 1984.
- [19] Schmell, M. J. et al.: *J. Bacteriol.*, 152: 950—953, 1982.
- [20] Smith, C. J. and M. A. Gonda: *Plasmid*, 18: 182—192, 1985.

## CLINDAMYCIN-RESISTANT MUTANTS OF A *METHANOBREVIBACTER* SPECIES

Xu Baoxiao    Xi Mingquan

(Shanghai Technical Teacher's College, Shanghai)

Repeated transfer in Balch no. 1 medium (lacking of acetate) containing clindamycin 10 µg/ml resulted in the selection of stable spontaneous mutants resistant to clindamycin from *Methanobrevibacter* strain HX. In slants containing clindamycin, cells of resistant mutants occurred in long chains. In roll tubes containing clindamycin, colonies were dark pale in color. After incubation for 21 days in medium containing and having

no clindamycin, methane production of the mutant strains was comparable with each other. Mutant strains showed cross-resistance to erythromycin and kanamycin.

### Key words

*Methanobrevibacter*; Clindamycin-resistant mutant