

• 研究论文 •

利用链霉素耐药性突变筛选抗菌活性放线菌

沈 玲¹, 郭正彦¹, 姬志勤¹, 龙建友², 胡兆农¹, 吴文君^{*1}

(1 西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 广州大学 环境科学与工程学院, 广州 510006)

摘 要: 利用链霉素耐药性突变, 从天然无抗菌活性或活性微弱的 12 株放线菌中筛选活性菌株。在链霉素浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时共获得 99 株耐药菌株。通过抑菌活性测定, 发现 7 株耐药突变菌株的发酵液产生了抑制细菌活性, 其中仅耐药突变株 67S-14 所产生活性物质的遗传性能稳定。室内抑制真菌活性测定结果表明: 菌株 67S-14 发酵液对玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 的抑制率较原始菌株 Na 67 提高 50% 以上。该突变株在菌落形态方面与原始菌株存在较大的差异。Dokochilova 溶剂系统纸层析结果表明, 该活性物质可能为大环内酯类抗生素。HPLC 分析结果表明, 该抗生素可能是突变菌株 67S-14 产生的代谢产物。

关键词: 链霉素; 耐药性突变; 放线菌; 活性; 大环内酯类抗生素

中图分类号: S482.28

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)01-0061-07

Studies on the Screening of Bioactive Actinomycetes by Inducing Streptomycin Resistance Mutation

SHEN Ling¹, GUO Zheng-yan¹, JI Zh-qin¹, LONG Jian-you², HU Zhao-nong¹, WU Wen-jun^{*1}

(1. Institute of Pesticide, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China;

2 Scientific Institute of Environmental Project, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

Abstract The activation experiments of twelve natural inactive actinomycetes by inducing streptomycin-resistance mutation were carried out. Ninety-nine mutants were obtained at streptomycin concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ (MIC). Seven mutants showed bioactivity against tested bacterial were screened out and one of them — the strain 67S-14 exhibited strong and constant inhibition effect. The results of antifungal activity in vitro showed that the inhibitory rate of fermentation broth of the strain 67S-14 was more than 50% higher than that of the wild strain No. 67 against *Exserohilum turcicum*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. The mutant 67S-14 showed obvious differences in the morphological characteristics compared with the wild-type strain No. 67. The results of paper layer chromatography demonstrated that the bioactive substance might be a macrolide antibiotic. HPLC analysis showed that the antibiotic might be a metabolite of mutant 67S-14.

Key words streptomycin resistance mutation; actinomycetes; bioactivity; macrolide antibiotic

收稿日期: 2007-10-18 修回日期: 2007-12-26

作者简介: 沈玲 (1980-), 女, 陕西西安人, 博士研究生, 主要从事天然产物用作农药的研究, E-mail: gzys2005@tom.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 吴文君 (1945-), 男, 四川洪雅人, 博士生导师, 主要从事农药化学和农药毒理学研究. 联系电话: 029-87093987 E-mail: wuwenjun@mw.suaf.edu.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (“973”计划) 项目 (2003CB114404).

从自然环境中发现新抗生素有 3 条基本途径: 直接从土壤和海洋微生物中分离; 对已知抗生素的产生菌进行基因改造, 从而使其产生新抗生素; 改变发酵培养条件, 使已知抗生素的产生菌产生新抗生素^[1]。作为天然抗生素的主要来源之一, 放线菌产生的活性化合物已超过 1 万个, 占有微生物活性代谢物的 45%, 其中大多是由链霉菌产生的^[2]。但近年来从放线菌中发现新抗生素的难度越来越大, 究其原因, 一是已知抗生素的分布丰度远高于未知抗生素, 按照常规方法筛选到新抗生素的几率很低; 二是链霉菌在环境中的分布丰度远高于稀有放线菌, 稀有放线菌的分离和培养均存在较大的难度^[3-4]。“核糖体工程”的概念最早是由 Och 等学者于 1996 年提出的, 即在微生物中引入能够作用于核糖体的抗生素耐药性突变(如链霉素、庆大霉素等), 从而影响微生物的次生代谢产物^[5-6]。该方法首先在提高已知抗生素的产量上取得了成功, 经“核糖体工程”而产生的诱变菌株其抗生素发酵单位最高可以提高数十倍^[7-11]。后来的研究发现, 诱变菌株除了提高抗生素产量以外, 还可以产生其他抗生素^[12-15]。这一发现的意义在于丰富了新抗生素的来源途径, 即已知抗生素的产生菌和非抗生素产生菌经过“核糖体工程”诱变后均可能产生新的抗生素。

本项研究根据“核糖体工程”的原理, 采用链霉菌对 12 株未表现明显抑菌活性或活性微弱的放线菌进行抗性诱导突变, 以玉米大斑病菌和蜡状芽孢杆菌为指示菌对其诱变菌株进行了抑菌活性筛选, 获得了一株对细菌和植物病原真菌都具有显著抑菌活性的菌株 67S-14, 并对其形态特征和产生的抑菌活性物质进行了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

1.1.1 试验菌株

原始菌株: 12 株非抗生素产生菌, 均为西北农林科技大学农药研究所自陕西关中土样中分离到的放线菌。

供试菌种: 蜡状芽孢杆菌 *Bacillus cereus*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、大肠埃希氏菌 *Escherichia coli*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*, 均购自中国科学院普通微生物菌种保藏管理中心; 白菜软

腐病菌 *Erwinia carotovora*、小麦赤霉病菌 *Gibberella zeae*、玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 和玉米弯孢叶斑病菌 *Curvularia lunata*, 均由西北农林科技大学植物病理研究室提供。

1.1.2 抗生素 硫酸链霉素, Sigma 公司产品, 购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.1.3 培养基

斜面和分离平板培养基(改良高氏培养基 Modified Gause No. 1): 可溶性淀粉 10 g, 蛋白胨 1 g, NaCl 2 g, KNO₃ 3 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, K₂HPO₄ 0.5 g, CaCO₃ 0.02 g, VB 混合液 1 mL, agar 14 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2(每 mL VB 混合液含 VB₁、VB₂、VB₃、VB₆、肌醇和对-氨基苯甲酸各 0.5 mg)。

发酵培养基: 小米浸出液 1 000 mL, 葡萄糖 10 g, 酵母提取物 1.5 g, 蛋白胨 3 g, NaCl 2.5 g, CaCO₃ 2 g, VB 混合液 1 mL, pH 7.5。

活性测定培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基。

1.1.4 仪器与试剂 Shimadzu LC-6AD 高效液相色谱仪, 具二极管阵列检测器和 Class V P 色谱工作站; HPD-800 大孔吸附树脂(河北沧州宝恩化工有限公司); 甲醇为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 孢子悬浮液的制备 取新鲜培养的放线菌斜面一支, 加入 5 mL 无菌生理盐水(1%)反复冲洗, 制成孢子悬浮液。经无菌擦镜纸过滤后, 收集单孢子悬液, 镜检并调整单孢子的浓度约为 10⁶ 个/mL 左右^[16]。

1.2.2 链霉素最小抑制浓度的测定 将制备好的单孢子悬浮液分别涂布于含有不同浓度链霉素(0~500 μg/mL)的分离平板上, 28℃培养 7~10 d 以不含链霉素的培养基平板为对照。观察并记录不同平板上的菌落生长状况, 未长菌落的链霉素最小浓度即为链霉素对该菌的最小抑制浓度(MIC)^[17]。

1.2.3 链霉素抗性突变株的分离 取新鲜单孢子悬液适量, 精确加入链霉素溶液使其终浓度为 MIC 浓度。经涡旋震荡使孢子和药剂混匀, 制成带药的单孢菌悬液, 低温放置 6 h。再经适当稀释, 取 5 μL 溶液涂布于不含药液的培养基平板上, 28℃下培养 10 d, 生长出的菌落即为抗生素耐药菌株。根据形态差异和菌落特性挑选菌株。将

耐药菌株在含有链霉素的固体平板上反复纯化, 分别接斜面并于 -4°C 保存。

1.2.4 抗菌活性测定

琼脂块法初筛: 将纯化后的链霉素耐药菌株用直径 0.6 cm 的打孔器制成菌饼, 反贴在含有指示菌的检测平板上, 28°C 培养 3 d (真菌)、 37°C 培养 1 d (细菌) 后测定抑菌圈的大小^[18]。

摇瓶发酵复筛: 挑取初筛入选菌株的菌饼接入装有 40 mL 发酵液的 250 mL 三角瓶中, 28°C 、 180 r/min 振荡培养 7 d 过滤菌丝体和发酵液, 采用管碟法^[19]和抑制菌丝生长速率法^[20]分别进行活性测定。

1.2.5 活性菌株的传代稳定性测定 将活性菌株在培养基平板上连续转接 10 代, 每代培养 7 d 再经摇瓶发酵测定其发酵液的抗菌活性。

1.2.6 原始菌株与活性菌株的形态特征比较

在培养基平板上划线涂菌并插入盖玻片, 28°C 培养 $5\sim 7\text{ d}$ 肉眼观察菌落特征如气丝、基丝和色素。适时取片并在显微镜下观察二者的菌丝和孢子形态^[21]。

1.2.7 原始菌株与活性菌株对链霉素的耐受水平比较 将活性菌株与原始菌株的孢子悬浮液分别涂布于含有不同浓度链霉素的平板上, 28°C 培养 $5\sim 7\text{ d}$ 观察并记录平板上的菌落数, 比较二者对链霉素的耐受水平差异。

1.2.8 抑菌活性物质的初步研究 采用 Doskochibva 溶剂系统对供试发酵液进行纸层析实验, 结合生物自显影绘制活性物质在 8 个溶剂体系中的展开曲线, 再通过与已知抗生素在相同溶剂体系中的展开曲线比对, 初步判断该抗生素类别^[19]。实验中所用溶剂系统: I. 水饱和的正丁醇; II. 水饱和的正丁醇, 内含 2% 对甲苯磺酸 (质量分数, 下同); III. 正丁醇-乙酸-水 ($2:1:1, \text{V/V}$, 下同); IV. 水饱和的正丁醇, 内含 2% 六氢吡啶; V. 以正丁醇饱和的 0.5 mol/L 、 $\text{pH } 7.0$ 的磷酸缓冲液; VI. 正丁醇饱和的水, 内含 2% 对甲苯磺酸; VII. 苯-甲醇 ($4:1$), 滤纸先用 0.5 mol/L 、 $\text{pH } 7.0$ 的磷酸缓冲液处理后晾干; VIII. 甲醇-水 ($3:1$), 水内含 3% 氯化钠, 滤纸先用 5% 硫酸钠处理后晾干。

1.2.9 原始菌株与突变菌株代谢产物的 HPLC 分析 将原始菌株与突变菌株在相同条件下平行发酵后, 分别取 2 种发酵液各 500 mL , 经 50 g

HPD-800 大孔吸附树脂静态吸附 8 h , 滤去发酵液, 再用去离子水洗脱至流出液无色, 最后用 50 mL 甲醇洗脱, 减压浓缩甲醇洗脱液至近干, 重新用甲醇定容, 待测。将处理好的原始菌株和突变菌株的发酵液分别进行 HPLC 检测。色谱条件为: Sinochrom ODS-AP 色谱柱, $4.6\text{ mm (i.d.)} \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$; 流动相甲醇 (分析纯); 紫外检测波长 367 nm ; 进样量 $3\text{ }\mu\text{L}$; 流速 1 mL/min 。

2 结果与分析

2.1 链霉素耐药性突变株的分离结果

选取 12 株无活性或活性微弱的放线菌 (抑菌圈 $< 2\text{ mm}$) 作为原始菌株, 采用耐药性突变的方法, 对 12 株放线菌进行了链霉素诱导突变和抗菌活性筛选, 在分离平板上共获得 99 株耐药菌株。以玉米大斑病菌和蜡状芽孢杆菌为指示菌进行活性初筛和复筛, 除菌株 No. 67 的耐药菌株产生了明显的抗菌活性以外, 其余 11 株菌的耐药株均未表现出明显的抗菌活性。因此, 以菌株 No. 67 为研究对象, 对其耐药菌株及其抗菌活性进行进一步研究。

2.2 链霉素对 No. 67 菌株的 MIC 值

根据固体平板上的菌落生长情况确定链霉素对 No. 67 菌株的 MIC 值 (表 1)。由表 1 可以看出, 在链霉素浓度为 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时, No. 67 菌株孢子的死亡率为 100% , 因此链霉素对 No. 67 菌株的 MIC 值为 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。

2.3 耐链霉素菌株的获得及活性筛选

用 $25\text{ }\mu\text{g/mL}$ (即 MIC 浓度) 的链霉素按 1.2.3 节的方法对 No. 67 菌株的孢子悬浮液进行处理, 共获得 47 株耐药菌株。诱变前后菌株的菌落形态发生了明显变化, 对照平板上的菌落直径为 $4\sim 7\text{ mm}$, 而经过链霉素处理的菌落长势较弱, 生长缓慢, 单菌落直径只有 $2\sim 4\text{ mm}$, 少许菌落如针尖点状平铺于固体平板上。首轮抗菌活性初筛后发现, 7 株耐药菌株对蜡状芽孢杆菌表现出明显的抑菌活性, 但除 67S-14 菌株对玉米大斑病菌的抑制活性明显高于原始菌株外, 其余 6 个菌株对玉米大斑病菌在供试浓度下未表现出明显的抑制作用 (表 2)。

表 1 链霉素不同剂量对 Na 67菌株孢子的处理效果

Table 1 Effect of streptomycin on spores of strain Na 67 at different concentration

链霉素剂量 /(μg/mL) Streptomycin concentration	生长状况 Growth	菌落总数 (× 10 ⁶) /(CFU / mL)	死亡率 (%) Death rate
0	++	4 157±0.942	—
5	+	2 056±0.128	50.54±3.07
10	+	0 677±0.093	83.71±2.24
15	+ -	0 089±0.014	97.86±0.34
20	+ -	0 014±0.005	99.66±0.12
25	-	0	100
30	-	0	100
30	-	0	100

注: “+”表示生长良好; “+ -”表示微弱生长; “-”表示不生长。图中数据均为 3次重复的平均值。

Note ++ : well + : ordinary + - : weak — : none growth. All values were means of three replicates

表 2 Na 67菌株与耐药菌株发酵液对供试病原菌的抑制活性

Table 2 Inhibition activity of fermentation broths of the strain Na 67 and the mutants against tested pathogens

供试病原菌 Tested pathogens	抑制作用 Inhibitory effect							
	Na 67	67S-4	67S-5	67S-6	67S-7	67S-12	67S-14	67S-17
蜡状芽孢杆菌 Bacillus cereus	-	12 mm	12 mm	13 mm	10 mm	10 mm	17mm	12 mm
		(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)
玉米大斑病菌 Exserohilum turcicum	25.0%	-	-	-	-	-	67.2%	-

注: “+++”表示抑菌圈非常清晰,“-”表示无抑菌圈或抑制率低于原始菌株,“%”表示菌丝抑制率。

Note “+++” means distinct “-” means no inhibitory ring or lower inhibition rate than wild strain, “%” means mycelium inhibitory rate

2.4 活性菌株 67S-14的抗菌活性

采用抑制菌丝生长速率法,测定了 Na 67菌株和耐药突变株 67S-14的发酵液对供试的 5种植物病原真菌的抑制活性(表 3)。从表 3可以看出,

与原始菌株相比,耐药突变株 67S-14发酵液对 5种供试病原真菌的抑制活性均有显著提高,其中对玉米大斑病菌的抑制效果最为明显,抑制活性从 25%提高到 67.2%(相当于 2.7倍)。

表 3 Na 67菌株与耐药株 67S-14发酵液对 5种植物病原真菌的抑制活性

Table 3 Inhibition activity of fermentation broths of the strain Na 67 and the mutant 67S-14 against five plant pathogens

供试真菌 Tested pathogens	抑制率 Inhibitory rate(%)	
	原始菌株 Wild strain No. 67	耐药菌株 Mutant 67S-14
小麦赤霉病菌 Gibberella zeae	47.2	84.5
玉米大斑病菌 Exserohilum turcicum	25.0	67.2
番茄灰霉病菌 Botrytis cinerea	26.2	58.5
棉花枯萎病菌 Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum	25.0	63.0
玉米弯孢叶斑病菌 Curvularia lunata	50.1	78.2

采用管碟法测定了原始 Na 67菌株和耐药突变株 67S-14的发酵液对供试的 6种病原细菌的抑制活性,结果见表 4。可以看出,原始菌株发酵液对供试病原细菌均无明显的抑制活性,而耐药突

变株 67S-14的发酵液对供试的革兰氏阳性细菌均有较好的抑制活性(如图 1),但对革兰氏阴性细菌无活性。

表 4 Na 67菌株与耐药株 67S-14对供试病原细菌的抑制活性比较
Table 4 Inhibition activity of fermentation broths of the Na 67 and the mutant 67S-14 against six pathogen bacterium

供试细菌 Tested bacterial	菌种编号 Strain number	抑菌圈直径 Diameter of inhibitory circle/mm	
		原始菌株 Wild strain Na 67	耐药菌株 Mutant 67S-14
蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	CGMCC1. 1846	-	17.0 + + +
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	CGMCC1. 88	-	16.0 + +
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	CGMCC1. 1636	-	-
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	CGMCC1. 89	-	17.5 + + +
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CGMCC1. 2031	-	-
白菜软腐病菌 <i>Erwinia carotovora</i>	-	-	-

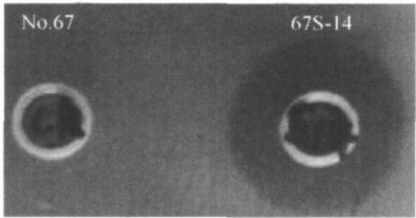


图 1 原始菌株 Na 67与耐药突变株 67S-14的
发酵液对蜡状芽孢杆菌的抑制活性比较
Fig 1 Inhibition effect of fermentation broth of
the wild strain Na 67 and the mutant 67S-14
against *B. cereus*

2.5 活性菌株 67S-14的传代稳定性

将活性菌株 67S-14纯化制备 F1~F10代, 分批摇瓶发酵并测定活性(图 2)。结果说明, 67S-14菌株传代 10代, 其对蜡状芽孢杆菌的抑制活性基本保持不变, 说明该菌株具有较好的遗传稳定性。

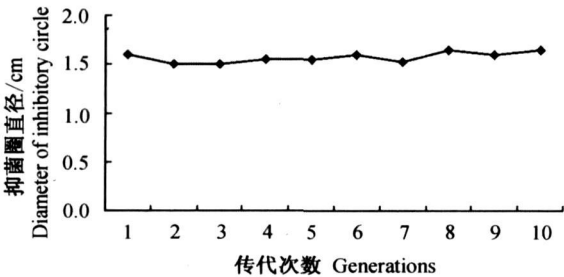


图 2 耐药菌株 67S-14连续转接 10代对
蜡状芽孢杆菌的活性稳定性
Fig 2 Activity of fermentation broth of the
67S-14 that descended for ten generations
against *B. cereus*

2.6 Na 67菌株与耐药菌株 67S-14的形态比较

对 Na 67菌株和 67S-14菌株的菌丝和孢子形态进行观察, 如图 3(A)。通过插片法在显微镜下观察菌丝形态, 结果发现 Na. 67 菌株的菌丝纤

细, 无隔, 孢子链微曲, 而 67S-14菌株的菌丝形态与 Na 67菌株无明显差别, 但几乎不产生孢子。

67S-14菌株与 Na. 67菌株的菌落形态差异主要表现在(图 3B): Na. 67在培养平板上的菌落圆形突起, 气生菌丝为乳白色, 绒状而且茂盛, 基内菌丝浅黄色; 67S-14菌株的菌落平坦, 边缘齿状, 气生菌丝较少, 为浅黄褐色, 基内菌丝浅褐色, 并有浅黄色色素产生。从培养周期看, 67S-14生长比原始菌株缓慢, 孢子产生滞后。

2.7 对链霉素的耐受水平比较

根据原始菌株和耐药突变株 67S-14在链霉素梯度平板上的生长状况, 比较二者的耐受水平(表 5)。从表 5可以看出, 链霉素对原始菌株的 MIC 为 25 $\mu\text{g/mL}$, 而对耐药突变株 67S-14的 MIC 为 35 $\mu\text{g/mL}$, 说明该耐药突变株对链霉素产生了一定程度的耐药性。

2.8 活性物质的初步定性研究

根据抗生素在捷克八溶剂体系中的比移值(R_f), 绘制出活性成分的展开曲线(图 4)。从图 4A 中看出, 活性成分在第 I、II、III、IV 和 VII 5个展开剂中的 R_f 值都接近 1.0, 在第 V、VI 和 VIII 系统中也有较大的迁移, 说明该抗生素的极性较小。与典型抗生素纸层析图谱比对^[13], 发现该抗生素的图谱与大环内酯类红霉素的图谱较为相似, 因此初步判断菌株 67S-14所产抑制细菌的活性物质可能是大环内酯类抗生素。

2.9 原始菌株与突变菌株代谢产物的 HPLC 分析

原始菌株和突变菌株的发酵液经大孔吸附树脂富集、净化后, 进行反相 HPLC 分析, 其色谱图如图 5所示。对比两个样品的色谱图可以发现, 其最大的差异在于 67S-14在保留时间 $t = 6.8 \text{ min}$ 处出现了一个 Na 67中没有的峰, 该峰的紫外最大吸收波长为 367 nm。

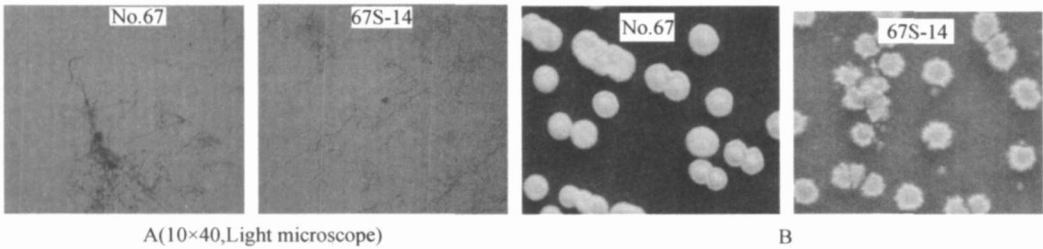


图 3 No 67菌株与耐药株 67S-14的菌丝形态 (A)和菌落形态 (B)比较

Fig 3 Mycelium morphology (A) and colony characteristics (B) of the strain No 67 and 67S-14

表 5 No 67菌株与耐药突变株 67S-14对链霉素的耐受性比较

Table 5 Comparison of streptomycin-resistance between wild strain No 67 and mutant 67S-14

菌株 Strain	链霉素剂量 Streptomycin concentration/($\mu\text{g}/\text{mL}$)								
	10	15	20	25	30	35	40	50	60
原始菌株 Wild strain	++	++	+-	-	-	-	-	-	-
耐药菌株 Mutant 67S-14	++	++	+-	+-	+-	-	-	-	-

注: “+”表示生长良好; “+-”表示微弱生长; “-”表示不生长。图中数据均为 3 次重复的平均值。

Note ++ : well ++: ordinary; +-: weak -: none growth. All values were means of three replicates

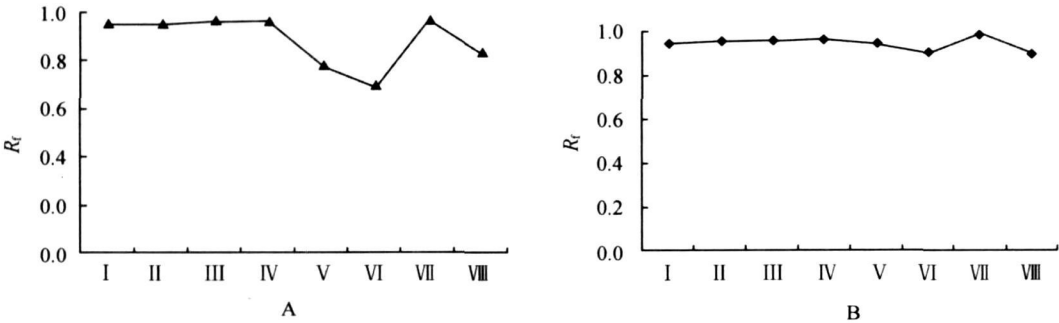


图 4 菌株 67S-14 发酵液 (A) 和红霉素 (B) 在八溶剂体系中的纸层析图谱

Fig. 4 The PC result of fermentation broth of the 67S-14 (A) and erythromycin(B) in eight solvent systems

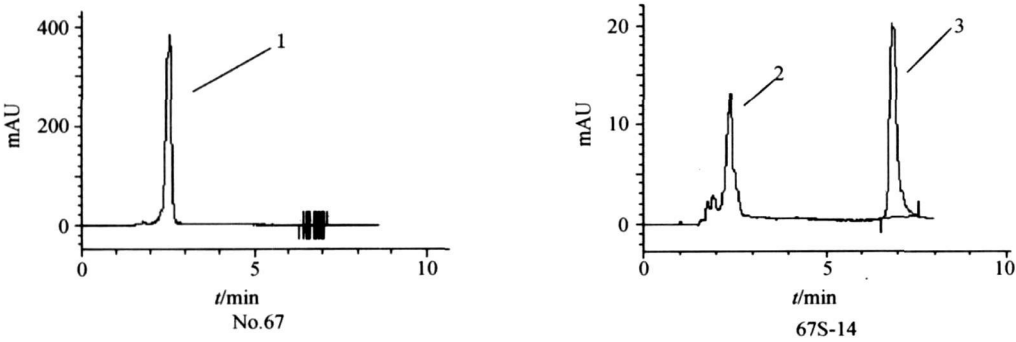


图 5 No. 67 菌株与耐药株 67S-14 发酵液甲醇洗脱液的 HPLC 分析

Fig. 5 HPLC chromatogram of methanol eluent of fermentation broths of strain No. 67 and the mutant 67S-14

在分析柱上对净化过的 67S-14 发酵液进行多次超载进样, 峰 3 单独收集, 其他流出液合并收集为一个馏分, 脱溶后采用纸片法测定两个馏分对蜡状芽孢杆菌的抑菌活性。结果表明, 仅峰 3 馏

分表现出明显的抑菌活性。目前已通过硅胶柱层析和重结晶的方法从该发酵液中分离到 150 mg 纯物质, 并采用 HRMS ESIMS MS NMR 以及 R 等方法对其进行结构鉴定。初步结果表明, 该

化合物可能为一新的大环内酯类抗生素(相关内容将另文报道)。采用 LC/MS/MS 对 67S-14 发酵液进行了分析,证实峰 3 与分离到的化合物为同一物质。

3 结论与讨论

本研究以天然的 12 株无活性或活性微弱的放线菌为材料,引入链霉素耐药性突变,得到一株对植物病原真菌和细菌都具有较好抗菌活性的耐药突变株 67S-14 并对其抑菌活性、形态特征、活性物质进行了研究。从二者的生理特征比较来看,引入链霉素耐药性突变能够改变微生物的生理特征,如生长速率减慢、孢子量减少、气生菌丝稀少等等,这一点与许多文献报道的相似。

与原始菌株 Na 67 相比,耐药突变株 67S-14 的发酵液对供试病原真菌的抑制活性显著提高,对供试的革兰氏阳性细菌产生了显著的抑制活性,这说明链霉素耐药性突变影响了菌株的次生代谢过程,经 HPLC 分析发现该突变菌株产生了不同于原始菌株的活性产物。

此外,“突变株”67S-14 仅仅是根据表观特征来定义的,其遗传因子是否发生了变异及其机制尚不清楚。需要利用分子生物学的手段对这两个菌株之间的同源性进行分析,同时需对二者的 rpsL 基因和 16S rRNA 序列进行对比研究。

本项研究再次证明,利用链霉素耐药性突变作用于微生物的核糖体,使之发生变化并改变其次生产物的代谢途径,从而获得具有农药开发价值的活性化合物,不失为一条开发“无用菌株”资源的新途径。

致谢:西北农林科技大学植物保护学院植物病理系宗兆锋教授在菌株形态观察中给予了帮助,特此致谢。

参考文献:

- [1] SOUZA N J, GANGULI B N. Strategies in the Discovery of Drugs From Natural Sources [J]. *Annu Rep Med Chem*, 1982, 17: 301-310.
- [2] J NOS B R D Y. Bioactive Microbial Metabolites [J]. *J Antibiot*, 2005, 58(1): 1-26.
- [3] WATVE M G, TIEKOO. How Many Antibiotics Are Produced by the Genus *Streptomyces*? [J]. *Arch Microbiol*, 2001, 176: 386-390.
- [4] BALTZ R H. Antibiotic Discovery from Actinomycetes Will a Renaissance Follow the Decline and Fall? [J]. *Sci News*, 2005, 55: 186-196.
- [5] HESKETH A, OCHI K A. Novel Method for Improving *Streptomyces coelicolor* A3(2) for Production of Actinorhodin by Introduction of rpsL (Encoding Ribosomal Protein S12) Mutations Conferring Resistance to Streptomycin [J]. *J Antibiot*, 1997, 50: 532-536.
- [6] OCHI K, OKAMOTO S, TOZAWA Y, et al. Ribosome Engineering and Secondary Metabolite Production [J]. *Adv Appl Microbiol*, 2004, 56: 155-184.
- [7] HU H F, OCHI K. Novel Approach for Improving the Productivity of Antibiotic-producing Strains by Inducing Combined Resistant Mutations [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 1885-1902.
- [8] OCHI K, HOSoya Y. Genetic Mapping and Characterization of Novel Mutations Which Suppress the Effect of a rbcL Mutation on Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *J Antibiot*, 1998, 51: 592-595.
- [9] OKAMOTO-HOSoya Y, SATO T, OCHI K. Resistance to Paromomycin is Conferred by rpsL Mutations Accompanied by an Enhanced Antibiotic Production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *J Antibiot*, 2000, 53: 1424-1427.
- [10] HOSoya Y, OKAMOTO S, MURAMATSU H, et al. Acquisition of Certain Streptomycin-resistant (str) Mutations Enhances Antibiotic Production in Bacteria [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 2041-2074.
- [11] TAMEHRO N, HOSAKA T, XU J, et al. Innovative Approach for Improvement of an Antibiotic-overproducing Industrial Strain of *Streptomyces albus* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69: 6412-6417.
- [12] SHIMA J, HESKETH A, OKAMOTO S, et al. Induction of Actinorhodin Production by rpsL (Encoding Ribosomal Protein S12) Mutations that Confer Streptomycin Resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2) [J]. *J Bacteriol*, 1996, 178: 7276-7284.
- [13] YU Zhi-bin(于志斌), ZHU Tian-jiao(朱天骄), CUI Cheng-bin(崔承彬), et al. 用核糖体工程技术二次开发海洋微生物菌株资源的研究 [J]. *High Technology Letters(高技术通讯)*, 2006, 11(11): 1190-1194.
- [14] LAI C X, XU J, TOZAWA Y, et al. Genetic and Physiological Characterization of rpoB Mutations that Activate Antibiotic Production in *Streptomyces lividans* [J]. *Microbiology*, 2002, 148: 3365-3373.
- [15] HU H F, ZHANG Q, OCHI K. Activation of Antibiotic Biosynthesis by Specified Mutations in the rpoB Gene (Encoding the RNA Polymerase β -Subunit) of *Streptomyces lividans* [J]. *J Bacteriol*, 2002, 184: 3984-3991.
- [16] OCHI K. Metabolic Initiation of Differentiation and Secondary Metabolism by *Streptomyces griseus* Significance of the Stringent Response (ppGpp) and GTP Content in Relation to A Factor [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169: 3608-3616.
- [17] SUNDE M, NORSTRÖM M. The Genetic Background for Streptomycin Resistance in *Escherichia coli* Influences the Distribution of M₁Cs [J]. *J Antimicrob Chem*, 2005, 56: 87-90.
- [18] JIANG Yun(姜云), HUANG Li-li(黄丽丽), CHEN Chang-qing(陈长卿), et al. 一株拮抗番茄叶霉病菌的放线菌筛选、鉴定及发酵条件研究 [J]. *Acta Microbiologica Sinica(微生物学报)*, 2007, 47(4): 622-627.
- [19] ZHANG Zhi-ping(张致平). *Microbial Pharmacy(微生物药理学)* [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2003: 18-19.
- [20] ZHOU De-qing(周德庆). *Microbiology Laboratory Manual(微生物学实验手册)* [M]. Shanghai(上海): Shanghai Scientific and Technical Publishers(上海科学技术出版社), 1986: 121-123.
- [21] SHIRLINGE B, GOTTLIEB D. Methods for Characterization of *Streptomyces* Species [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, 16: 313-340.

(Ed JIN SH)