

小麦土霉素抗性内生细菌分离、鉴定及分布

杨清香¹, 王育水², 张 晶¹, 张 昊¹, 朱孔方¹, 李学梅¹

(1. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007; 2. 焦作师范高等专科学校理化生系, 454001)

摘要: 研究通过培养的方法研究了小麦根际土壤、根、茎、叶各部位的土霉素抗性内生菌数量、种类和分布特征。结果表明, 小麦内生菌数目在 1×10^4 cfu g⁻¹ ~ 1.95×10^6 cfu g⁻¹ 之间, 土霉素抗性内生菌数目介于 6.9×10^3 cfu g⁻¹ 和 5.67×10^5 cfu g⁻¹, 从中分离出 22 株土霉素抗性内生菌, 包括 15 株 G⁺ 和 7 株 G⁻, 经 16s rRNA 基因序列分析, 它们与 Bacillaceae, Alphaproteobacteria 和 Gammaproteobacteria 三大类微生物聚在一起, 其中 Bacillaceae 类细菌最多, 占 59.1%。土霉素抗性的 *Bacillus licheniformis* 在小麦根际土壤、根、茎等器官中都分离得到表明该抗性菌种在小麦内生系统中具有较高的传播性; 具有土霉素抗性的人类机会致病菌 *Bacillus cereus* 和 *Stenotrophomonas* 属的细菌在小麦的根际土壤、根以及叶子中也均分离到, 但是在小麦种子中没有分离到任何土霉素抗性的内生菌。

关键词: 内生菌; 小麦; 土霉素; 抗生素抗性

文章编号: 1000-0933(2009)08-4580-08 中图分类号: Q143 文献标识码: A

Isolation and distribution of oxytetracycline-resistant entophytic bacteria in plant of wheat

YANG Qing-Xiang¹, WANG Yu-Shui², ZHANG Jing¹, ZHANG Hao¹, ZHU Kong-Fang¹, LI Xue-Mei¹

¹ College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

² Department of Physical-Chemistry and Biology, Jiaozuo Teachers College, 454001, China

Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(8): 4580 ~ 4587.

Abstract: In this study, the quantity, species and distribution characteristics of oxytetracycline resistant entophytic bacteria in wheat rhizosphere, root, stem, leaves and seeds were researched by isolation and cultivation methods. The results indicated that the total amount of entophytic bacteria in wheat was between 1×10^4 cfu g⁻¹ and 1.95×10^6 cfu g⁻¹, in which the oxytetracycline resistant strains were from 6.9×10^3 cfu g⁻¹ to 5.67×10^5 cfu g⁻¹. 22 strains of oxytetracycline resistant entophytic bacteria were isolated, including 15 G⁺ and 7 G⁻. The 22 isolates were clustered into Bacillaceae, Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria based on their full length 16S rRNA gene sequences. Among them, strains of Bacillaceae occupied the predominance with 59.1% in various wheat organs. Oxytetracycline resistant strains of *Bacillus licheniformis* were isolated from wheat rhizosphere, root and stem indicating their high abilities of spreading. Opportunistic human pathogenic bacterial strains with oxytetracycline resistance such as *Bacillus cereus* and *Stenotrophomonas* sp. were also isolated from various wheat organs. No oxytetracycline resistant bacterium could be detected from wheat seeds.

Key Words: Entophytic bacteria; wheat; oxytetracycline; antibiotic resistant

抗生素作为防病和促进畜禽生长物质而在养殖业中大量使用。在所有消费的抗生素中, 有 50% 用于畜牧业和水产养殖业, 其中将近一半用于动物生长促进剂。大多数兽药抗生素不能被动物完全吸收, 而是以原型或代谢物的形式排放到环境中, 对环境生物及生态产生深远影响, 并最终对人体健康产生危害^[1,2]。大量

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20677014); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2006CB403306)

收稿日期: 2009-04-09; 修订日期: 2009-05-26

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yangqx66@163.com

滥用抗生素的最大危害是使许多细菌产生抗药性,加速抗生素抗性基因在细菌间的传播和扩散^[3]。据世界卫生组织报道,已经将抗生素抗性基因作为下个世纪威胁人类健康的最大挑战^[4]。动物养殖过程滥用抗生素一方面会诱导动物体内产生抗性细菌,并通过粪便进入土壤;另一方面残留的抗生素可以通过粪便施肥进入土壤,诱导土壤微生物产生抗性^[5]。目前检测到的土壤中抗生素残留浓度范围为 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 级到 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 级。其中四环素高达 300 ng g^{-1} ,黄胺药高达 11 ng g^{-1} ^[6]。

植物内生菌是指那些在其生活史的某一阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的微生物^[7]。通常认为,植物根际土壤中的细菌是植物内生菌的主要来源^[8]。因此通过各种途径进入土壤环境中的抗生素抗性细菌和抗性基因有可能在植物根际土壤——植物系统间进行传播,进而对人类造成风险。Berg 认为,植物的根际是人类机会致病菌的重要储存库,多种细菌种属例如 *Burkholderia*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* 和 *Stenotrophomonas* 等可以进入植物和人类寄主之间的相互作用系统中,其在植物根际和在人类器官或组织中的定植机制相似^[9]。在植物根际的微环境中,高的微生物竞争、各种各样抗生素暴露以及增强的基因水平转移率对抗生素抗性细菌以及多重抗生素抗性细菌的产生起着不可低估的作用^[9]。但有关这方面的研究报道还很有限。小麦是我国的重要粮食作物,在播种之前普遍施用有机肥,我们曾经报道了土霉素等畜禽用抗生素对小麦根际微生物群落结构的影响,小麦根际存在大量的微生物会受到土壤环境中抗生素类污染物的影响而发生显著的抗性群落变化^[10]。那么,这些抗性细菌和抗性基因能否通过根际土壤——植物内生菌在植株内进行传播?通过哪些类群的细菌传播?为此,本研究从大量小麦的器官中分离抗性内生菌,研究这些抗性内生菌的分布和转移情况,该研究将对阐明抗性细菌在土壤——植物系统间的传播途径具有重要意义。

1 材料方法

1.1 样品的采集及处理

小麦植株采自河南师范大学试验田及新乡市郊农田。小麦植株处于种子待成熟期。经过调查河南师范大学试验田在小麦播种之前施用试验鱼池中沉积的鱼粪;市郊农田在小麦播种前施用农家有机肥。根际土壤通过刮取小麦苗期根系附着土壤获得。所有取样按 5 点取样法取样,每点 40 株,混匀后按根、茎、叶、种子 4 部分分别取样。

1.2 小麦内生细菌的分离

样品的表面消毒方法参考文献^[11],分离内生细菌的方法参考文献^[12],表面消毒效果的检查参考文献 Schulz^[13]的方法进行。

选取未受病虫害侵害的小麦植株,按根、茎、叶、种子 4 部分分别取样,用 3% 的升汞浸泡 5min,用无菌蒸馏水冲洗 3 次,并取最后一次冲洗液涂布平板培养进行消毒效果检查。消毒彻底的植物材料在无菌状态下研磨,将匀浆液稀释后涂布牛肉膏蛋白胨平板,分离小麦内生菌,同时设定土霉素 (15 mg L^{-1}) 抗性处理,分离出抗性内生菌。内生菌的计数采用平板菌落计数法。根据平板上长出菌落的形态、颜色、大小等挑取不同单菌落,反复划线纯化后接斜面保藏。

1.3 内生细菌理化性质测定

按照沈萍^[14]方法对所分离的内生菌进行革兰氏染色、芽孢染色、淀粉水解和油脂降解试验。

1.4 内生细菌的分子生物学鉴定

所分离的内生菌按照传统方法进行 DNA 的提取^[15],采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACCTTGTACGACTT-3') 对菌株分别扩增总 DNA 中的细菌 16S rDNA 片段。PCR 反应条件:94℃ 变性 5 min;94℃ 60 s,55℃ 45 s,72℃ 90s,25 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物用 DNA 回收试剂盒购(上海生工)回收后连接到 pMD18-T Vector(大连宝生物工程)转化到 *E. coli* DH5 α 中,挑取阳性克隆子,由上海生工生物工程公司进行测序。所测序列递交 Genbank 获得序列号并通过 Blast 比对,利用 MEGA4.1 软件构建细菌的系统进化树,综合各菌株的理化性质测定结果确定分类地位。

1.5 土霉素残留检测

(1) 取 5g(20ml) 样品加入 50ml 离心管, 加 20ml EDTA- MC II Vaine 溶液, 混匀震荡器上混匀, 超声波清洗器超声提取 10min, 4000r/min, 离心 10min。移出上清液, 在沉淀中加入 5ml EDTA- MC II Vaine 溶液, 进行第二次提取, 合并提取液以 4000r/min, 离心 10min。上清液用定性滤纸过滤, 滤液待净化。

(2) 固相萃取柱净化 预先用 20ml 甲醇, 20ml 水活化 SPE 小柱, 然后把样品提取液全部倒入小柱缓慢抽滤, 用 2ml EDTA- MC II Vaine 溶液冲洗, 再用 20ml 水洗, 弃去全部洗出液, 继续抽真空 10min, 加 4ml 甲醇草酸溶液, 将四环素类抗生素从 SPE 小柱上洗脱下来, 40℃ 减压蒸干, 用 1ml 流动相溶解, 供色谱分析。色谱条件: 色谱柱 Hypersil ODS(200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 0.01 mol/L 的草酸水溶液和乙腈(60:40); 流速 1.0 ml/min; 进样环体积 20μL; 柱温 25℃; 检测波长 278nm^[16]。

2 结果与讨论

2.1 小麦抗性内生细菌的数量与分布

分别对两个采样点采集的小麦进行内生菌及抗性内生菌数量统计。根、茎、叶、未收获的种子中所分离到的内生菌总数及抗性内生菌数目见表 1, 小麦根际土壤中细菌数目及抗性细菌数目也被统计, 虽然土壤中含有大量的细菌及抗性细菌, 但从菌落形态上判断, 细菌类群较为单一。

表 1 小麦根际及植株内生菌数目及抗性内生菌比例

Table 1 Cfu number of bacteria in wheat rhizosphere and entophyte and their proportions

分离部位 Separated parts	内生菌总数 (cfu g ⁻¹) Total number of entophytic bacteria		抗性内生菌数 (cfu g ⁻¹) Number of oxytetracycline resistance entophytic bacter		抗性比例 (%) Proportions	
	采样点 A Sample site A	采样点 B Sample site B	采样点 A Sample site A	采样点 B Sample site B	采样点 A Sample site A	采样点 B Sample site B
	Sample site A	Sample site B	Sample site A	Sample site B	Sample site A	Sample site B
根际土壤 Rhizosphere soil	1.3 × 10 ⁸	6.4 × 10 ⁸	4.25 × 10 ⁷	3.8 × 10 ⁷	32.69	5.937
根 Root	1.95 × 10 ⁶	6.75 × 10 ⁵	2.2 × 10 ⁴	5.67 × 10 ³	1.13	0.84
茎 Stem	2.2 × 10 ⁵	5.0 × 10 ⁴	2.7 × 10 ⁴	0	12.27	0
叶 Leaves	1.25 × 10 ⁵	4.0 × 10 ⁴	6.9 × 10 ³	0	5.52	0
种子 Seed	8.5 × 10 ⁴	1.0 × 10 ⁴	0	0	0	0

采样点 A: 河南师范大学试验田; 采样点 B: 新乡市郊农田 Sample site A: experimental field of Henan Normal University; Sample site B: farmland of Xinxiang Suburb

由表 1 可见, 两块田地小麦根际土壤中可培养的细菌总数虽然在一个数量级, 即 10⁸ cfu g⁻¹, 但农田小麦根际检测到的细菌总数明显高于试验田。两块试验田中内生菌数目从根到种子均呈现出依次递减的趋势, 数目在 10⁴ 到 10⁶ cfu g⁻¹ 之间; 该结果与乔宏萍等的研究结果一致^[17], 他们的研究发现, 从根到籽粒, 小麦内生菌的数目依次递减, 数量在 7.8 × 10⁵ 到 2.8 × 10⁵ 之间。

农田小麦中内生菌总数和土霉素抗性内生菌数目都明显低于试验田小麦, 并且试验田采样点根、茎、叶多个部位中均发现了土霉素抗性内生菌的存在, 而农田采样点中仅在根中发现了土霉素抗性内生菌。造成这两块田中小麦土霉素抗性内生菌数目的差别还需要进一步通过实验数据确定。所选用的两个采样点在施肥方式上具有明显差异, 河南师范大学试验田比邻试验鱼塘, 长期施用试验鱼池中沉积的鱼粪, 养鱼饲料中添加有金霉素和土霉素; 市郊农田在小麦播种之前施用农家有机肥。抗生素用于渔业养殖可以通过 3 种途径诱导环境中微生物的抗性增加, 一方面可能在鱼体内诱导抗性微生物产生, 排放到水体和鱼粪中; 另一方面残留在鱼粪中的抗生素会诱导鱼粪中的微生物产生抗性, 由于鱼粪中含有大量未被鱼吃进去的饲料, 应该会残留大量抗生素, 因此这种方式可能很重要; 第 3 种是通过施肥过程诱导土壤中的微生物产生抗性^[5]。这 3 种途径产生的抗性微生物都会最终进入土壤环境中, 由于鱼饲料中添加的抗生素是金霉素和土霉素, 都属于四环素类抗生素。四环素类抗生素具有相同的抗性机制和基因^[3], 因此, 造成河南师范大学试验田小麦根际土壤中土霉素抗性细菌数量明显增加。根际土壤中的抗性细菌可以通过根际——植物系统进入植物成为内生菌^[8],

因而在这块地的小麦中检测到的土霉素抗性内生菌也明显增多。

而农田小麦主要施用由猪粪和秸秆混合沤制而成的农家肥,含有抗生素的风险显然比较小,这可能是其小麦根际土壤中和内生菌中抗性细菌数量较少的重要原因之一。另一方面,猪和鱼相比对抗生素的吸收和代谢也会有一定差别,这样也会造成其粪便中抗生素残留和抗生素抗性细菌的数量差别,进而造成两块地土壤中抗性细菌数量差别,这方面推论还需要进一步试验验证。利用甲醇—乙腈抽提、高效液相色谱测定方法对两块田根际土壤中土霉素残留进行过检测,均未测出土霉素。这一结果一方面可能与测定方法的土霉素回收率太低有关;另一方面,在采样时已经是小麦的成穗期,距播种前施肥时间近 7 个月,此时土壤中残留的抗生素也会因为微生物降解或植物吸收而含量降低,达不到测量限度。有关抗生素在饲料、鱼粪以及土壤中的迁移转化过程需要进一步研究。虽然土壤中抗生素的残留检测不到,但抗生素对环境乃至植物内生菌系统中抗性微生物数量的影响仍然明显可见。

2.2 小麦土霉素抗性内生细菌的分离及理化性质测定

根据平板菌落形态,从两个采样地根际土壤和大量小麦植株及未收获的种子内共分离出 22 株抗土霉素的抗性内生细菌,按取样点划分,8 株分离自郊区农田小麦植株,另外 14 株分离自试验田小麦植株;按分离部位划分,根际土壤和根中各分离到 7 株,茎和叶中分别分离到 4 株。小麦根际土壤中虽然抗性内生菌的数目较多,但菌落形态高度一致,因此仅选取几株作为代表。通过对这 22 株细菌的常规理化性质进行测定,确定其中 15 株为 G^+ , 7 株为 G^- 。多数内生菌具有水解淀粉的能力,只有 5 株菌具有油脂水解的能力。结果汇总在表 2 中。

2.3 小麦土霉素抗性内生菌的分子生物学鉴定

将从抗性平板上分离得到的 22 株内生菌分别进行总 DNA 提取、16s RNA 基因扩增,测序后提交 Genbank,获得序列号为 FJ493039-FJ493060。将测序结果和相关种属的代表菌株 16S rRNA 部分序列一起用 MEGA4.1 软件中的 neighbor-joining 分析法构建系统发育树,如图 1。

由图 1 可见,所分离的 22 株抗性细菌主要聚集在三类中: Bacillaceae、Alphaproteobacteria 和 Gammaproteobacteria 中。其中好氧的 Bacillaceae 最多,共 13 株,占所分离菌的 59.1%,包括 *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina* 3 个属,它们均为 G^+ , 产芽孢的类群,与理化性质鉴定结果相符。

在对小麦根际微生物群落结构的研究中发现,小麦根际主要的优势菌群为芽孢杆菌属细菌^[10]。众多的研究也证明芽孢杆菌为小麦体内的有益内生细菌,对于小麦纹枯病、小麦全蚀病均有拮抗作用,还与营养物质循环及利用等有关^[17,18]。在这 13 株土霉素抗性细菌中,有 6 株属于 *Bacillus licheniformis*, AG-1 和 AJ-

表 2 22 株小麦土霉素抗性内生菌理化性质测定

Table 2 Physical-chemical properties of 22 strains of oxytetracycline-resistant entophytic bacteria isolated from wheat

编号 Number	菌株 Strain	革兰氏染色 Gram stain	芽孢染色 Spore stain	淀粉水解 Starch hydrolysis	油脂水解 Oil hydrolysis
1	AJ-1	+	+	+ /2	-
2	AJ-2	+	+	+ /2.5	-
3	AJ-3	-	-	+ /0.5	-
4	AJ-4	+	+	-	-
5	AY-1	-	-	+ /1.3	-
6	AY-2	+	+	+ /1.5	+
7	AY-3	-	-	+ /1	-
8	AY-4	+	+	+ /0.5	-
9	AG-1	+	+	+ /2.5	-
10	AG-2	-	-	+ /2.2	-
11	AT-2	+	+	-	+
12	AT-4	+	-	-	-
13	AT-6	-	-	-	-
14	AT-7	+	+	-	-
15	BG-1	+	+	+ /1	-
16	BG-2	+	+	+ /2	+
17	BG-4	+	+	-	-
18	BG-5	+	+	-	+
19	BG-7	-	+	-	-
20	BT-1	-	-	-	-
21	BT-2	+	+	+ /1.8	+
22	BT-4	+	-	+ /1.5	-

G: 从试验田小麦根中分离, J: 从试验田小麦茎中分离, Y: 从试验田小麦叶中分离, T: 从试验田小麦根际土壤中分离; A: 试验田采样点, B: 农田采样点; +: 阳性; -: 阴性; 淀粉水解酶中“/”后数值代表淀粉水解圈直径(cm) A: sample site of experimental field, B: sample site of farmland; G: sample from wheat root, J: sample from wheat stem, Y: sample from wheat leaf, T: sample from wheat rhizosphere; +: positive, -: negative. Values after "/" indicate the diameter of starch hydrolysis (cm)

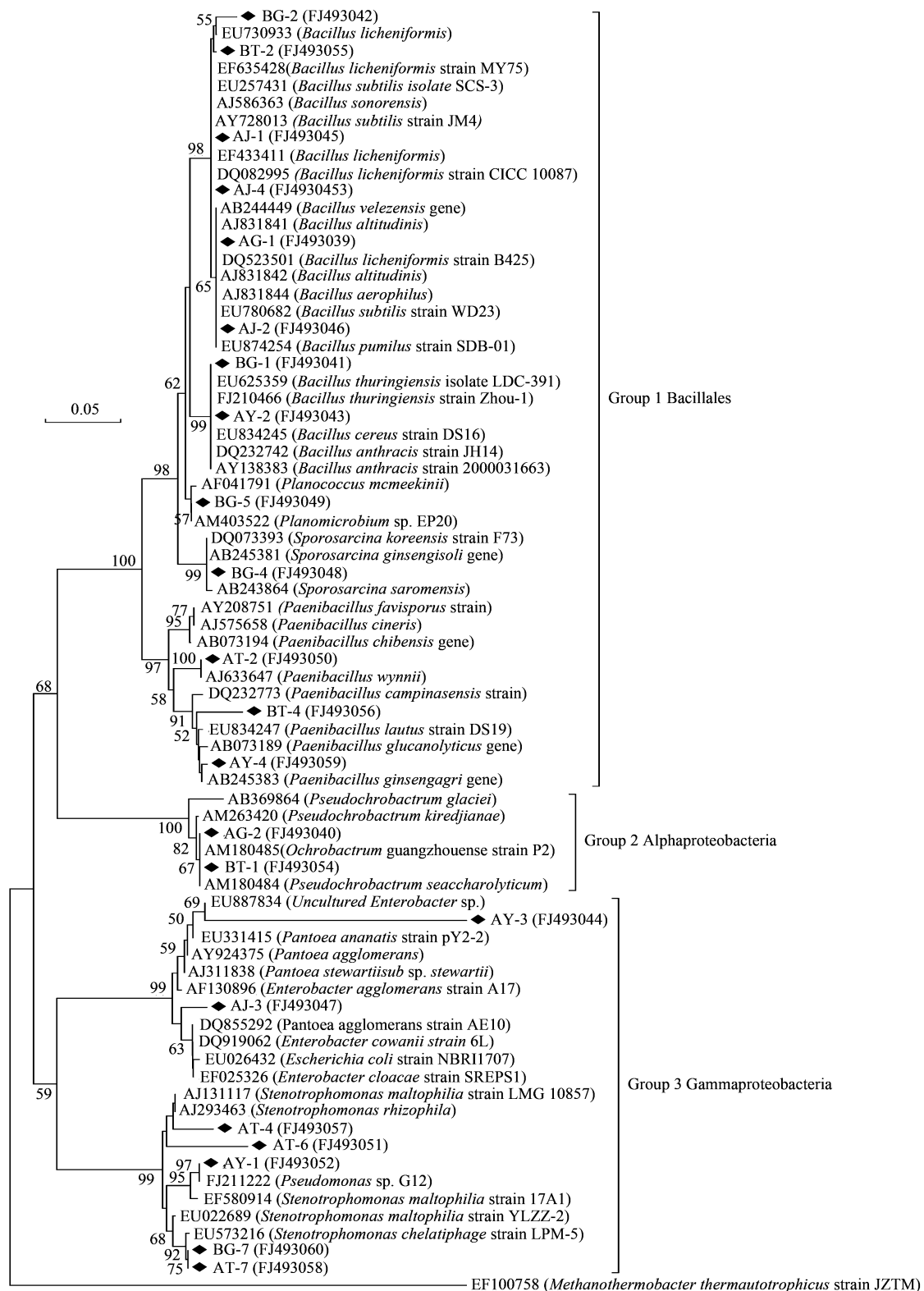


图1 所分离的22株小麦抗性内生菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of 22 strains of oxytetracycline-resistant entophytic bacteria isolated from wheat

根据菌株16S rRNA基因全长序列,利用MEGA4.1软件构建而成,并进行1000次Bootstraps检验 The tree was constructed based on 16S rRNA gene full length sequences using MEGA 4.1; Bootstrap values are given for 1000 replicates

2 与具有发酵功能的菌株 *Bacillus licheniformis* strain B425 (DQ523501) 相似性最高^[19]; 而 BG-2 和 BT-2、AJ-1 和 AJ-4 分别与 *Bacillus licheniformis* (EU730933)、和一株未发表的 *Bacillus licheniformis* strain MML2501 (EU344793) 具有比较近的亲缘关系, 该菌株具有生物防治的功能; 而 AY-2 与菌株 *Bacillus cereus* strain DS16 (EU834245) 聚在一起; BG-4 与一株未发表的从种植人參的土壤中发现的菌株 *Sporosarcina ginsengisoli* (AB245381) 相似性最高; AT-2 与含有固氮基因 *nifH* 的 *Paenibacillus wynnii* sp (AJ633647) 极为相似^[20], BT-4 与 *Paenibacillus lautus* (EU834247) 相似。Kelly 等研究发现^[21, 22], 抗生素抗性基因在自然界的转移主要通过质粒、转座子、转化、接合等方式, 在近缘的种属中更容易发生, 小麦根际以及植株内存在大量产芽孢细菌, 因而在根际和内生菌中检测到这一类土霉素抗性菌株的可能性必然会较大。

另外 7 株菌与 Gammaproteobacteria 聚为一簇共同构成了进化树中的第二大类群。其中属于 *Stenotrophomonas* 属的细菌共 5 株, 即 AT-7、BG-7 与 *Stenotrophomonas chelatiphaga* (EU573216) 具有最大相似性, 该菌也具有与本研究相近的抗生素抗性^[23]; AY-1 与一株未发表的抗真菌活性功能菌 *Stenotrophomonas maltophilia* strain 17 (EF580914) 相似性最高; AT-4 和 AT-6 在种属地位上与 *Stenotrophomonas* sp. 接近。另外两株 AJ-3 和 AY-3 与 *Enterobacter* sp. 聚在一起。

构成进化树中第三类群的两株菌 (AG-2 和 BT-1) 与 Alphaproteobacteria 中的 *Pseudochrobactrum* 亲缘关系比较近。

在分离的具有土霉素抗性的小麦内生菌中, 有 1 株 *Bacillus cereus* 和 5 株 *Stenotrophomonas* 属的细菌。在 Berg^[9] 的综述中报道, *Stenotrophomonas* 属的细菌在自然界地球元素循环中起着重要的作用, 在植物保护、芳香物质生物降解和土壤修复等应用微生物和生物技术中被广泛关注。然而该属的细菌, 特别是 *S. maltophilia* 也是人类重要的机会致病菌。近 10a 来, 该菌在严重受损或免疫抑制的病人中引起死亡的比例明显升高, 与多种临床症状例如心内膜炎、呼吸道感染等密切相关。该菌在小麦、马铃薯、葡萄、葵花、玉米等多种植物的根际发现, 也从医院的多种环境中经常分离到例如透视镜、透析仪、制冰机、各种治疗仪等。一些研究迹象表明, 不管从环境中分离的还是从临床来源的这类菌在许多表面, 例如人类的呼吸道上皮细胞和草莓的根际, 具有相同的定植能力。而且发现这些菌可以分泌 DNA 酶、RNA 酶、蛋白酶、酯酶等多种酶, 能够对多种抗生素产生抗性。而 *Bacillus cereus* 是引起皮肤和伤口感染的重要致病菌, 在葡萄和马铃薯的根际都经常分离到, 这些菌对真核细胞的拮抗性表现在对植物和人体细胞具有相同的拮抗能力, 因而可以广泛在植物根际和人体细胞表面定植^[9]。由此可见, 这些抗性细菌在环境或者作物中的存在会通过多种渠道进入人体致病, 而畜禽养殖过程中滥用抗生素会通过各种方式大大提高环境中乃至作物内生菌中抗生素抗性细菌的比例, 对人类健康造成威胁。

2.4 土霉素抗性内生菌在小麦植株内的种属分布特征

对 22 株土霉素抗性内生菌在小麦体内的分布特征进行比较, 如表 3 所示。通过对土霉素抗性内生菌在小麦体内不同器官的空间分布比较发现, 分离自不同器官的土霉素抗性内生菌在分类地位上具有相似性。芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 从根际土壤到根、茎、叶中均有发现, 特别是抗土霉素的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 在根际、根、茎中都分离到, 推测该抗性菌株比较容易在植物内生系统中传播和扩散。人类机会致病

表 3 22 株土霉素抗性内生菌在小麦体内的分布

Table 3 Distribution of 22 oxytetracycline resistant endophytic bacteria in wheat plant

部位 Location	种属 Species
根际 Rhizosphere	<i>Bacillus licheniformis</i> (BT-2), <i>Paenibacillus</i> (AT-2, BT-4), <i>Pseudochrobactrum</i> (BT-1) <i>Stenotrophomonas</i> (AT-4, AT-6, AT-7)
根 Root	<i>Bacillus licheniformis</i> (AG-1, BG-2), <i>Bacillus thuringiensis</i> (BG-1), <i>Sporosarcina ginsengisoli</i> (BG-4), <i>Planococcus mcmeekinii</i> (BG-5), <i>Pseudochrobactrum</i> (AG-2), <i>Stenotrophomonas</i> (BG-7)
茎 Stem	<i>Bacillus licheniformis</i> (AJ-1, AJ-4, AJ-2), <i>Uncultured Enterobacter</i> (AJ-3)
叶 Leaves	<i>Bacillus cereus</i> (AY-2), <i>Paenibacillus</i> sp (AY-4), <i>Uncultured Enterobacter</i> (AY-3), <i>Stenotrophomonas</i> (AY-1)

菌 *Stenotrophomonas* 属的菌和 *Bacillus cereus* 不仅如 Berg 所述^[9] 在根际土壤中发现, 而且在小麦根和叶子中也分离到, 并且是具有土霉素抗性的菌株。可见, 这类微生物随着作物内生菌的传播性很大, 应引起高度重视。另外, 也看到小麦植株的同一器官中也存在分类地位差别较大的不同种属的土霉素抗性菌株, 那么这些抗性菌株是通过抗性基因的属间转移获得? 还是具有不同的抗性基因? 目前正在通过分子生物学手段进行深入研究。

3 结论

本研究通过对小麦根际土壤、小麦植株内土霉素抗性内生菌的分离、鉴定和分布研究得到如下结论:

(1) 从小麦根际土壤、到小麦植株的根、茎、叶和种子中土霉素抗性内生菌数目逐渐减少, 数量在 10^4 到 10^6 cfu g⁻¹ 之间, 其中在小麦种子中未检测到土霉素抗性内生菌。

(2) 从大量小麦植株和未收获的种子中共分离到 22 株土霉素抗性内生菌, 经理化性质测定和分子生物学鉴定, 主要聚集在 Bacillaceae、Alphaproteobacteria 和 Gammaproteobacteria 中。其中 Bacillaceae 类细菌最多, 占所分离菌的 59.1%。

(3) 土霉素抗性菌株在小麦不同器官的分布以 *Bacillus licheniformis* 最普遍, 分布于各器官中; 值得注意的是, 在小麦根际土壤、根以及叶子中均分离到引起人们关注的具有土霉素抗性的人类机会致病菌 *Bacillus cereus* 和 *Stenotrophomonas* 属的菌株。

Reference:

- [1] Vaclavik E, Halling-Sorensen B, Ingerslev F. Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil. *Chemosphere*, 2004, 56(7): 667–76.
- [2] De Liguoro M, Cibin V, Capolongo F, et al. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere*, 2003, 52: 203–212.
- [3] Kim S R, Nonaka L, Suzuki S. Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 23(7): 147–156.
- [4] World Health Organization (WHO). WHO Annual report on infectious disease: Overcoming antimicrobial resistance; World health organization: Geneva, Switzerland, 2000. <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/> (accessed Feb 1, 2006).
- [5] Kong W D, Zhu Y G. A review on ecotoxicology of veterinary pharmaceuticals to plants and soil microbes. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(1): 1–9.
- [6] Bruhn S T, Beck I C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. *Chemosphere*, 2005, 59(4): 457–465.
- [7] Carrol G C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. Fokkema N J, van den Heuvel J. Eds *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. 7(6): 205–222.
- [8] Gray E J, Smith D. Intercellular PCPR: Commonalities and distinction in the plant-bacteria signaling process. *Soil Biol Biochem*, 2005, 37: 395–412.
- [9] Berg G, Eberl L, Hartmann A. Minireview The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(11): 1673–1685.
- [10] Yang Q X, Zhang J, Zhu K F, et al. Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(7): .
- [11] Germuda J J. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. *Can J Microbiol*, 1998, 44: 844–851.
- [12] Lupwayi N Z, Clayton G W, Hanson K G, et al. Populations and functional diversity of bacteria associated with barley, wheat and canola roots. *Can J Soil Sci*, 2004, 84(6): 245–254.
- [13] Schulz B, Wanke U, Draeger S. Endophytes from herbaceous and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *J Mycological Research*, 1993, 97(12): 1447–1450.
- [14] Shen P. *Microbiology experiment (the third edition)*. Beijing: Higher Education Press, 1999.
- [15] Yang Q X, Jia Z J, Liu R Y, et al. Molecular diversity and anammox activity of novel planctomycete-like bacteria in the wastewater treatment system of a full-scale alcohol manufacturing plant. *Process Biochemistry*, 2007, 42(2): 180–187.

- [16] Liu H, Zhang G P, Liu C Q. Determination of chloramphenicol and three tetracyclines by solid phase extraction and high performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007,35(3):315—319.
- [17] Qiao H P, Huang L L, Kang Z S. Endophytic bacteria isolated from wheat and their antifungal activities to soil-borne disease pathogens. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006,17(4):690—694.
- [18] Liu Z M, Wang X, Zhao J H, *et al.* Colonization of the beneficial endophytic bacillus cereus B946 in wheat. *Chinese Journal of Biological Control*, 2005,21(2):113—116.
- [19] Nielsen D S, Teniola O D, Ban-Koffi L, *et al.* The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int J Food Microbiol*, 2007,114(2):168—86.
- [20] Rodríguez-Díaz M, Lebbe L, Rodelas B, *et al.* *Paenibacillus wynnii* sp. nov, a novel species harbouring the nifH gene, isolated from Alexander Island, Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005,55(5):2093—2099.
- [21] Kelly B G, Vespermann A, Bolton D J. The role of horizontal gene transfer in the evolution of selected foodborne bacterial pathogens. *Food and Chemical Toxicology*, 2009,47:951—968.
- [22] Kelly B G, Vespermann A, Bolton D J. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology*, 2009,47:969—977.
- [23] Kaparullina E, Doronina N, Chistyakova T, *et al.* *Stenotrophomonas chelatiphaga* sp. nov, a new aerobic EDTA-degrading bacterium. *Syst Appl Microbiol*, 2009,32(3):157—62.

参考文献:

- [5] 孔维栋,朱永官. 抗生素类兽药对植物和土壤微生物的生态毒理学效应研究进展. *生态毒理学报*, 2007,2(1):1~9.
- [14] 沈萍. 微生物学实验(第三版). 北京:高等教育出版社,1999.
- [16] 刘虹,张国平,刘丛强. 固相萃取—色谱测定水、沉积物及土壤中氯霉素和3种四环素类抗生素. *分析化学*, 2007,35(3):315~319.
- [17] 乔宏萍,黄丽丽,康振生. 小麦内生细菌及其对根茎部主要病原真菌的抑制作用. *应用生态学报*, 2006, 17(4):690~694.
- [18] 刘忠梅,王霞,赵金焕,等. 有益内生细菌 B946 在小麦体内的定殖规律. *中国生物防治*, 2005,21(2):113~116.