

稀有放线菌分离方法的研究

杨宇容¹ 徐丽华¹ 段若玲¹ 金 湘² 王启兰³ 姜成林¹

(1) 云南大学省微生物研究所¹, 昆明, 650091; 2) 新疆农科院微生物研究所², 乌鲁木齐, 830000; 3) 青海中科院西北高原生物研究所³, 西宁, 810008; 第一作者 33 岁, 女, 助理研究员;)

摘要 在培养基中加入 7 种不同抑制剂、不同的碳源或氮源及对土壤样品进行预处理等选择性分离各类放线菌。结果发现对土壤真菌、细菌有明显抑制作用而对放线菌无抑制作用的只有重铬酸钾, 认为它是选择性分离放线菌的一种高效、便宜的抑制剂。在培养基中加入的碳源或氮源不同, 可分离到不同类型的放线菌, 找到了在分离不同类型的放线菌时培养基中较好的碳、氮源组合。建立了分离稀有放线菌的选择性分离程序, 得到了一种制备简便、菌落易辨认和挑菌, 土样不需预处理便可达到分离稀有放线菌目的的培养基(YM-2)。本文还对 HV 培养基进行了改良。

关键词 稀有放线菌, 分离方法, 抑制剂, 碳、氮源

分类号 Q 939.9

放线菌是具有巨大实用价值的一类微生物。目前从微生物中发现的大约 8000 种生物活性物质, 有近 70% 是放线菌产生的。不仅如此, 放线菌还产生其他各种工农业有用的产品, 如酶制剂等。但是我们不得不承认, 百年来人们只分离到大约 10% ~ 20% 土壤放线菌^[1]。因此分离这 80% 以上的未知放线菌, 特别是其中的稀有放线菌是微生物资源开发的必要前提和关键之一。现代放线菌资源开发, 获得新的菌种也是必要条件之一。由此分离方法的研究显得更重要。国外一些公司和科研单位都把分离程序作为技术关键, 严加保密, 泄露者严加惩处。仅在生态学文献中才偶有放线菌分离方法的报道, 但一般都隐其要害, 且要晚 2~ 3 年。我国在这方面的研究工作很少, 与国外尤其是日本、美国、英国等国有较大差距。我们将把放线菌分离方法作为一个专门的课题进行研究, 以期不断建立, 逐步完善分离不同类型放线菌的高效、简便的选择性分离程序。现报道有关结果。

1 材料和方法

1.1 培养基及分离方法 抑制剂的选择实验, 培养基用 HV 琼脂(Humic acid-Vitamin agar)^[2-4], 酵母膏-麦芽膏琼脂, 甘油-门冬酰胺琼脂^[5]。碳、氮源选择实验, 培养基用察氏琼脂(去碳源或氮源)+VitB₆(1mg/L)。稀有放线菌分离基础培养基(我们把它称为 YM): K₂HPO₄ 1.0g, NaCl 0.8g, MgSO₄ 0.5g, CaCO₃ 0.1g, VitB₁ 0.5mg, VitB₂ 0.5mg, VitB₆ 0.5mg, 生物素 0.5mg, 烟酸 0.5mg, 微量盐 1ml, 琼脂 15g, 水 1000ml, pH 7.2 1kg/cm²灭菌 30min。

在此基础培养基中分别加入不同的碳、氮源及抑制剂,同时用 HV 琼脂作对照培养基分离稀有放线菌。土壤样品预处理,风干土样,120 °C 干热处理 1h,土悬液加入 0.05% SDS(十二烷基磺酸钠)或 1% 苯酚(5mmol 磷酸缓冲液, pH 7.0),40 °C,处理 20min 涂布于加有不同碳源、氮源、抑制剂的 YM 培养基和 HV 琼脂培养基上。以上所有放线菌的分离均采用平板稀释法^[28]下,培养 15~30d。

1.2 土样及菌株 土壤样品来自云南西双版纳、滇西、昆明地区和印度南部 45 株实验菌株(表 1)来自本实验室、ATCC、IFO、NRRL 和 CCCC。

1.3 放线菌鉴定 采用国内外通用的方法鉴定放线菌^[6]。

2 结果及讨论

2.1 抑制剂的选择

2.1.1 7 种抑制剂对各类微生物的作用 酵母膏-麦芽膏琼脂+VitB₆(1mg/L)分别加入重铬酸钾等 7 种抑制剂,对 22 个属(胞壁 I-IV 型)39 株已知放线菌,5 株真菌,1 株细菌进行平板稀释计数。实验结果(表 1)表明,利富平、柱晶白霉素、邻苯三酚对绝大多数(97%)的放线菌实验菌株均有抑制作用,而对真菌、细菌实验菌株无或抑制作用很小。不能用作分离放线菌的抑制剂。苯甲酸、水杨酸、苯甲醇对大多数包括真菌在内的实验菌株无抑制作用。重铬酸钾不仅对大多数(72%)的放线菌实验菌株无抑制作用,相反,有 56% 的放线菌菌株的菌落数比对照反而增多,而且重铬酸钾对真菌实验菌株抑制效果极好,无一个菌落生长,对细菌抑制效果稍差。在 YM 培养基中分别加入苯甲酸等 4 种从表 1 中选出的抑制剂,用平板稀释法分离 5 份土样,各类微生物的出现情况表明:加水杨酸、苯甲醇的平皿几乎不长放线菌;加苯甲酸的平皿有少量放线菌,但真菌污染严重无法挑放线菌;加重铬酸钾的平皿中放线菌菌落的数量与对照相比除一个平皿减少了 2 个菌落,一个平皿菌相同外,其他三个平皿菌落都大大增加了。从上述结果,可以看出,适量的重铬酸钾对放线菌不会起抑制作用,甚至对一些菌株还有一定的生长刺激作用。

2.1.2 重铬酸钾对细菌、真菌的抑制作用 甘油-门冬酰胺琼脂加重铬酸钾(50mg/L),用平板稀释法分离 35 份土壤的放线菌。结果表明,不加重铬酸钾的 35 个平皿,有 26 个(74%)真菌太多,无法挑到放线菌;加重铬酸钾的平皿仅 2 个长 1~3 个真菌菌落,对挑放线菌无多大影响。不加重铬酸钾的平皿,有 4 个因细菌太多无法挑放线菌,有 6 个难于挑菌;加重铬酸钾者,生长的细菌对挑放线菌无影响。我们先后从云南 10 多个地区采集土壤样品,每次都加重铬酸钾的培养基分离放线菌,均得到大体相同的结果。因此,完全可以肯定,重铬酸钾是一种可以抑制大多数土壤真菌、细菌,而不抑制放线菌的选择性高、效果好、便宜的抑制剂。

2.2 培养基中碳、氮源的选择 在去碳源的察氏琼脂+VitB₆(1mg/L)中分别加入菊糖(0.2%)等 5 种碳源或在去氮源的另一培养基中分别加入甲硫氨酸(0.05%)等 5 种氮源,对表 1 中的 45 株已知实验菌株进行平板稀释计数。结果表明,不同类型的放线菌利用碳、氮源也不同,而且有其规律性(见表 2)。胞壁 II-IV 型菌,其对碳源的最佳利用顺序为甘露聚糖、棉子糖、菊糖;而它们对氮源的最佳利用分别为色氨酸、胱氨酸、胱氨酸。根据上述结果,我们建议在分离不同类型放线菌时可采用最佳碳、氮源组合,即分离胞壁 II 型菌时,最佳组合为碳源-甘露聚糖,氮源-色氨酸;分离胞壁 III 型菌时,最佳组合为碳源-甘露聚糖,氮源-胱

氨酸; 分离胞壁 IV 型菌时, 最佳组合为碳源- 腐殖酸, 氮源- 胱氨酸; 分离稀有放线菌(胞壁 II- IV 型)时, 最佳组合为碳源- 肌醇, 氮源- 色氨酸, 分离一般放线菌时, 碳源- 甘露聚糖, 氮源- 组氨酸

表 1 7 种抑制剂对各类微生物的作用

Tab 1. Function of seven kinds of bacteristatic for various microorganism

菌 名	利福平	柱晶白霉素	邻苯三酚	苯甲酸	水杨酸	苯甲醇	重铬酸钾	对照
<i>S treptomycetes albus</i> A TCC 3004	152	-	0.5	1200	112	880	100	100
<i>S. g riseus</i> A TCC 23345	-	-	-	66	92	82	107	100
<i>S. aburaviensis</i> A TCC 23869	-	-	-	117	63	63	105	100
<i>S. alanosinicus</i> A TCC 15710	-	-	-	-	50	-	66	100
<i>S. kumm ingensis</i> A TCC 35682	20	-	-	86	71	66	110	100
<i>S. acrimycini</i> A TCC 19885	-	-	-	128	93	91	100	100
<i>S treptovercillum</i> sp. Y91- 3701	-	29	-	-	29	86	143	100
<i>S tv.</i> sp.	-	-	-	0.3	105	75	106	100
<i>M icromonospora yulongensis</i> V 81- 917	-	-	-	-	19	89	169	100
<i>A ctinoplanes m issouriensis</i> A TCC 14538	-	-	-	-	-	-	89	-
<i>A. violaceus</i> V 80- 610	-	-	-	-	-	-	180	-
<i>D actylosporangium fusco- aurantiacum</i> 2063	-	-	-	12	-	-	125	-
<i>M icrobispora rosea</i> NRR I B- 2632	-	-	-	100	-	-	100	100
<i>M b.</i> sp. V 93- 989	-	-	-	-	-	-	78	-
<i>M icrotetraspora pusilla</i> CCRC 11619	28	-	-	106	98	59	116	100
<i>M t. cineres</i> 80- 133	-	-	-	61	30	90	160	100
<i>M t. flavorosea</i> V 84- 4397	7	-	-	122	7	6	89	100
<i>A ctinonadura viridiflava</i> V 85- 5078	0.4	-	-	0.6	0.9	0.9	128	100
<i>A m. madura</i> CCRC 13639	-	0.02	-	53	42	53	33	100
<i>S treptosporangium</i> sp. V 87- 718	-	-	-	75	-	-	113	100
<i>S ts.</i> sp. V 93- 1051	0.4	-	-	121	16	139	165	100
<i>P lanobispora rosea</i> CCRC 13421	-	100	-	-	-	50	400	100
<i>P lanomonospora parantospora</i> CCRC 13425	-	-	-	8	-	-	13	100
<i>A ctinosynnema mirum</i> BRR I B- 12336	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A ctinobispora yunnanensis</i> V - 11981	-	-	-	-	-	-	-	100
<i>S accharomonospora viridis</i> CCRC 12633	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sm. janensis</i> V 86- 8217	113	-	-	116	105	105	108	100
<i>Sm.</i> JX17	-	256	-	62	-	42	55	100
<i>Them anomospora curvata</i> NRR I B- 1983	-	-	-	-	-	-	94	-
<i>Thm. fusca</i> CCRC 12532	-	-	-	31	94	44	231	100
<i>A mycolata autotrophica</i> CCRC 12444	-	-	-	33	-	33	33	100

<i>Amycolatopsis mediterranei</i> Isp 5501	58	-	-	85	103	64	162	100				
<i>Saccharothrix flava</i> CCRC 13328	0.2	-	-	48	24	14	-	100				
<i>Saccharopolyspora aurantiaca</i> V 84- 4001	-	0.05	-	60	30	13	107	100				
<i>nocardiosis dassonvillei</i> CCCCM 4 1170	-	-	-	50	-	25	80	100				
<i>Nocardia asteroides</i> TFO 3318	22	0.9	-	92	53	122	79	100				
<i>N. mexicana</i> TFO 3927	0.2	-	-	33	17	265	117	100				
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> TFO 3338	-	-	-	44	2	42	107	100				
<i>Rh. codochrous</i> 199	-	-	-	100	100	100	104	100				
<i>Aspergillus niger</i>	106	83	50	89	144	139	-	100				
<i>A. flavus</i>	15	38	92	62	31	100	-	100				
<i>Penicillium sp.</i>	449	226	190	116	95	80	-	100				
<i>Mucor hiemalis</i>	100	100	100	100	100	100	-	100				
<i>Trichoderma viride</i>	100	100	100	100	100	100	-	100				
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	313	100	69	47	202	100				

抑制剂用量: 利福平(20mg/L), 柱晶白霉素(10mg/L), 邻苯三酚(100mg/L), 苯甲酸(100mg/L), 水杨酸(200mg/L), 苯甲醇(1ml/L), 重铬酸钾(50mg/L). 值得提出的是, 由于我们所用作实验的碳源和氮源数量有限, 所谓“最佳碳、氮源组合”也是相对而言的, 这还有待于今后进一步作工作, 不断加以完善和改进

表 2 各胞壁类型放线菌菌株利用不同碳、氮源的百分比

Tab 2 Percentage of the different carbon- nitrogen source used by various type of actinomycetes with cell wall

序号	胞壁类型	株数	菊糖	棉子糖	甘露聚糖	腐殖酸	肌醇	甲硫氨酸	胱氨酸	色氨酸	组氨酸	粗角蛋白
1	I	16	17	50	100	0	17	50	33	33	83	66
2	II	4	50	75	100	25	25	75	75	100	100	75
3	III	12	58	83	92	33	58	92	100	92	92	83
4	IV	15	60	66	80	47	60	66	73	66	73	60
5	链轮丝菌	2	50	50	10	50	100	50	100	100	100	100
6	2~5 平均	31	55	69	93	39	60	71	87	90	91	80

2.3 稀有放线菌的选择性分离程序 以 YM 为基础培养基, 分别加入三组不同的碳源和氮源(表 3 中 YM 1- 3 号培养基). YM - 1: 碳源 - 菊糖, 氮源 - 色氨酸; YM - 2: 碳源 - 菊糖, 氮源 - 胱氨酸; YM - 3: 碳源 - 甘露聚糖, 氮源 - 组氨酸; 以上三组培养基中均加入 25mg/L 的重铬酸钾作为抑制剂 同时用 HV 琼脂作为对照培养基, 土样风干 120 热处理 1h, 土壤悬液用 1% 苯酚或 0.05% SDS 预处理后, 平板稀释法分离 10 份土壤中的稀有放线菌, 结果列于表 3

在所有的平皿中, 只有个别长有少量的真菌或细菌菌落, 不影响挑菌 加入 25mg/L 重

铬酸钾与常用的抑制剂NA (萘啶酸)+ 放线酮(即HV 琼脂培养基中所用抑制剂)的平皿相比菌落数量及种属上,前者多于后者,这一结果是对前面抑制剂选择实验的一个补充,因此,我们认为加入适量的重铬酸钾,完全可以代替原HV 培养基中的抑制剂即NA + 放线菌,从而大大降低了实验成本,也简化了操作

表 3 不同预处理在 4 种培养基上的分离结果

Tab 3 Result of isolation of different pretreatment in four kinds of medium

属 名	w (苯酚) = 1% 酚				0.05w (SDS) = 0.05% DS				未预处理(对照)			
	YM			HV	YM			HV	YM			HV
	1	2	3		1	2	3		1	2	3	
链霉菌属	38	28	21	134	266	297	255	507	250	317	238	526
<i>S. trep. tanycetes</i>												
小单孢菌属	208	157	119	216	113	198	74	228	56	89	48	347
<i>M. icran. onspora</i>												
小双孢菌属	3	6	1	-	1	2	6	2	-	3	3	2
<i>M. icrobispora</i>												
马杜拉菌属	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. ctinan. adra</i>												
小四孢菌属	-	-	1	2	-	-	3	1	-	-	-	-
<i>M. icrotetraspora</i>												
诺卡氏菌属	-	58	6	-	18	15	19	14	10	9	29	14
<i>N. ocardia</i>												
糖多孢菌属	4	-	-	-	-	-	10	-	9	6	-	-
<i>Saccharopoly spora</i>												
链孢囊菌属	-	-	-	27	-	8	3	4	-	11	-	7
<i>S. trep. tosporangium</i>												
指孢囊菌属	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	3
<i>D. actylosporangium</i>												
游动放线菌属	4	24	-	-	14	-	-	-	-	11	-	-
<i>A. ctinoplanes</i>												
束丝放线菌属	-	-	16	-	-	11	-	-	19	16	-	-
<i>A. ctinosynnemata</i>												
小瓶菌属	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ampullariella</i>												
总属数	5	6	7	5	5	6	7	7	5	8	4	6

用苯酚处理后,可大大减少链霉菌的数量。苯酚或 SDS 预处理后,小单孢的数量明显增多,这与 Nonmura, H. 所报道的结果相符^[2]。

在 HV 琼脂培养基中未分离到束丝放线菌、游动放线菌,而在 YM 1- 3 培养基中均分到大量束丝放线菌,其中 YM - 2 培养基中分离到的束丝放线菌最多。在四种培养基中仅在 YM 1- 2 中分到游动放线菌,而且主要集中在 YM - 2 培养基上,故此培养基可建议用作分离束丝放线菌或游动放线菌的选择性培养基。另外小四孢菌可在 YM - 3 和 HV 琼脂

培养基中分离到 HV 琼脂培养基中易分离到指孢囊菌 在土悬液未预处理的四种培养基平皿上, 菌落数量和种属数最多的是 YM - 2 培养基, 它比 HV 琼脂培养基的种属数多 25%, 而且能分离到大量游动放线菌和束丝放线菌 在培养基的配制上 YM - 2 培养基较 HV 琼脂培养基简便, HV 琼脂培养基中的腐殖酸为黑色, 配制出的平皿颜色较深, 而且在此培养基上长出的放线菌菌落一般都很小 不易辨认和挑菌, 所以我们一般在配制 HV 琼脂培养基时腐殖酸要经脱色后方可使用, 这样培养基的配制程序就很麻烦, 而且时间也长(需过夜澄清, 用上清液), 而使用 YM - 2 培养基, 制备简便, 此培养基平皿颜色浅, 放线菌菌落较大, 易辨认和挑菌, 同时不需预处理就可达到目的 综上所述, 我们建议稀有放线菌分离程序可采用: 风干土样, 120 °C 热处理 1h, 土悬液不需任何预处理, 平皿稀释法涂布于培养基 YM - 2 上

YM - 4 培养基: 甘露聚糖 2g, 胱氨酸 0.5g, K_2HPO_4 1.0g, $NaCl$ 0.8g, $MgSO_4 \cdot 0.5g$, $CaCO_3$ 1g, $VitB_2$ 0.5mg, $VitB_6$ 0.5mg, 生物素 0.5mg, 烟酸 0.5mg, 微量盐 1ml, 琼脂 15g, 水 1000ml, pH 7.2, 25~50mg/L 重铬酸钾 对于稀有放线菌的分离研究, 我们还只是起步阶段, 今后还要根据分离目的和对象不同, 不断改进和完善分离方法, 建立分离不同类型放线菌的高效、简便的选择性分离程序

致谢: Williams 教授 Lechevalier 教授, Labeba 教授, 阮继生教授赠送部分菌种; R. R. Balagurunathan 博士赠送部分土样, 一并致谢

参 考 文 献

- 1 Okami Y. Concepts and techniques for isolation and characterization of actinomycetes In: SM - ISBA '91 Workshop on Actinomycetes Madison: University of Wisconsin, 1991. 1~3
- 2 Nonomura H, Hayakawa M. New methods for the selective isolation of soil actinomycetes In: Okami Y, et al Biology of Actinomycetes'88 Tokyo: Japan scientific societies press, 1988. 288~293
- 3 Nonomura H. Studies on isolation, taxonomy and ecology of soil actinomycetes Actinomycetologica, 1989, 3: 45
- 4 Hayakawa M. Selective isolation methods and distribution of soil actinomycetes Actinomycetologica, 1990, 4: 95
- 5 Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of streptomycetes species Int J Syst Bacteriology, 1966, 16: 313

(下转第 413 页)

some structures would be destroyed

Key words cotyledon, mitosis index, high temperature, chromosome banding, chromosome

* * * * *

(上接第 408 页)

A Study on Isolation Methods of Rare Actinomycetes

Yang Yurou¹⁾ Xu Lihua¹⁾ Duan Ruoling¹⁾ Jiang Chenglin¹⁾ Jin Xiang²⁾
Wang Qilang³⁾

(1) Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, 650091, Kunming, PRC; 2)

Institute of Microbiology, Academy of Agricultural Sciences of Xinjiang, 930000, Wulumuqi, PRC; 3)

Institute of Biology in Northwest Plateau, Academy of Chinese Sciences of Qinhai, 810008, Xining, PRC)

Abstract The paper reports the results on selective isolation of actinomycetes by adding seven kinds of bacteristatic agent, and various carbon and nitrogen source in the medium. The results presented that potassium dichromate could inhibit obviously growth of fungus and bacteria in soil samples except actinomycetes, it was a high efficient, cheap bacteriostatic for selective isolation of actinomycetes, A suitable ratio of carbon- nitrogen source in the medium was found for selective isolation of various actinomycetes. The selective isolation procedure was established for isolation rare actinomycetes. Medium YM - 2 was recommended for selective isolation of rare actinomycetes. The HV medium was improved.

Key words rare actinomycetes, isolation methods, bacteristatic, carbon and nitrogen source