

文章编号: 1001-7453(1999)02-0045-05

选择性分离放线菌

徐成勇,袁 野,黎丹辉,夏欢耕,诸葛健

(无锡轻工大学生物工程学院,江苏无锡 214036)

摘要: 进行了土样的预处理试验,探讨了平板培养基中抑制剂重铬酸钾的最适浓度.结果表明,选择性分离放线菌的比较适宜的方法为:采集的土样在 28℃或室温条件下风干 10~20 d 后,将土壤悬浮液(10^{-1})于 40℃和 pH7 的条件下,加 6% 酵母膏和 0.05% SDS(5 mmol/L 磷酸缓冲液),震荡 20 min,水稀释至 10^{-2} ;或土壤悬浮液(10^{-1})于 50℃和 pH7 的条件下,加 6% 胨和 0.05% SDS(5 mmol/L 磷酸缓冲液),震荡 10 min,水稀释至 10^{-2} .然后用平板稀释法接菌在高氏合成 1 号琼脂+重铬酸钾(质量浓度为 250 mg/L)的平板培养基上,培养 7 d 后挑菌分离.

关键词: 放线菌;分离方法;预处理;抑制剂

中图分类号: Q93.335 **文献标识码:** A

自从 Waksman 和 Umezwa 揭示放线菌用途的多样性以后,人们发现放线菌作为抗生素、维生素、酶和酶抑制剂的产生菌具有重大的经济意义.已报道的 8 000 种生物活性物质,70% 左右来自放线菌.迄今为止能够从天然基质上分离出来进行人工培养的放线菌,只占确知存在的放线菌总数中的一小部分.国内外有关研究单位对放线菌分离方法的保密,阻碍着放线菌分离技术的提高.据杨宇容等^[2]报道,重铬酸钾对土壤真菌、细菌有明显的抑制作用,而对放线菌无抑制作用,可作为选择性分离放线菌的一种高效、便宜的抑制剂.Okami 等^[3]认为酵母膏等物质可活化土壤中放线菌的休眠孢子,而 SDS(十二烷基硫酸钠)可杀死土壤细菌和部分放线菌孢子,但这一作用随着用水稀释很容易消除.Hayakawa 等则建议用 0.05% 的 SDS(5 mmol/L 磷酸缓冲液配制)加 6% 的酵母膏于 40℃震荡 20 min. Ladislav 等的^[4]实验证明,加热处理可除去大多数无孢子菌体.

本文中对放线菌的选择性分离法进行了研究,以期得到一套比较完整、有效的分离方法.

1 材料与方法

1.1 培养基及分离方法

培养基采用高氏合成 1 号琼脂培养基;放线菌分离用平板稀释法^[1],涂布平板后培养 7 d,观察结果.

收稿日期: 1998-10-23;修订日期: 1999-02-27

作者简介: 徐成勇(1967年 6月生),男,安徽桐城人,博士研究生.

1.2 土样

无锡市郊梅园区水稻田土,编号 229,水份含量较高;无锡市郊梅园区菜地土,编号 230,水份含量中等;无锡市郊梅园区山坡土,编号 231,水份含量较低.

1.3 平板培养基中抑制剂重铬酸钾浓度的确定

231号土样 28℃条件下风干 10 d后,土壤稀释液(10^2)涂平板,每一处理有 3个重复.培养基中抑制剂重铬酸钾的质量浓度为:0, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500,单位为 mg/L.记录平板上的真菌、细菌和放线菌的菌落数.

1.4 土样预处理方法

土样采集后,在平板稀释法分菌前经过两个阶段的预处理.
第一阶段的预处理有 5种方法: 1) 采集的土样不作处理; 2) 采集的土样于 50℃高温处理 1 h; 3) 采集的土样于 120℃高温处理 1 h; 4)采集的土样于 28℃条件下风干 10 d; 5)采集的土样于 28℃条件下风干 20 d.

第二阶段的预处理有 7种方法:

- 1) 土壤悬浮液(10^1), 40℃, pH7, 6% 酵母膏震荡 20 min,水稀释至 10^2 ;
- 2) 土壤悬浮液(10^1), 40℃, pH7, 0.05% SDS(5 mmol/L磷酸缓冲液),震荡 20 min,水稀释至 10^2 ;
- 3) 土壤悬浮液(10^1), 40℃, pH7, 6% 酵母膏+ 0.05% SDS(5 mmol/L磷酸缓冲液),震荡 20 min,水稀释至 10^2 ;
- 4) 土壤悬浮液(10^1), 50℃, pH7, 6% 胨,震荡 10 min,水稀释至 10^2 ;
- 5) 土壤悬浮液(10^1), 50℃, pH7, 0.05% SDS(5 mmol/L磷酸缓冲液),震荡 10 min,水稀释至 10^2 ;
- 6) 土壤悬浮液(10^1), 50℃, pH7, 6% 胨+ 0.05% SDS(5 mmol/L磷酸缓冲液),震荡 10 min,水稀释至 10^2 ;
- 7) 土壤悬浮液(10^1)直接稀释至 10^2 .

将 35个预处理所得土壤悬浮液涂布平板,其中抑制剂重铬酸钾的质量浓度定为 250 mg/L,每个处理 3个重复,记录真菌、细菌和放线菌的菌落数.

土样放置冰箱, 4℃条件下 30 d后再次进行土样的预处理,处理方法不变.

2 结果与讨论

2.1 平板培养基中抑制剂重铬酸钾质量浓度的确定

培养 7 d后的观察结果见表 1.

从表 1可以看出,培养基中加入重铬酸钾的质量浓度为 0~ 200 mg/L时,放线菌菌落数大致保持在同一个水平,而细菌菌落数和真菌菌落数下降显著.当重铬酸钾质量浓度为 300 ~ 500 mg/L时,虽然细菌和真菌的生长得到了抑制,但放线菌的出菌率也大为下降,显著影响了放线菌的出菌分离.所以抑制剂重铬酸钾的质量浓度定为 250 mg/L较为适宜.

表 1 高氏合成 1号琼脂加入不同质量浓度重铬酸钾的分菌结果 菌落数/皿

重铬酸钾质量浓度/(mg/L)	放线菌	细菌	真菌
0	63	107	7
25	61	62	6
50	60	59	5
100	60	60	1
200	52	41	0
300	37	0	0
400	20	0	0
500	27	0	0

2.2 采样后土样预处理方法的确定

采样后共施行 35种土样预处理方法 ,培养 7 d后 ,分菌结果见表 2

表 2 采样后进行土样预处理的分菌结果

编 号	放线菌	细菌	真菌	编 号	放线菌	细菌	真菌	编 号	放线菌	细菌	真菌
229-Ⅰ 1	123	15	0	229-Ⅱ 1	135	3	0	229-Ⅲ 1	0	0	0
229-Ⅰ 2	121	5	0	229-Ⅱ 2	190	0	0	229-Ⅲ 2	1	0	0
229-Ⅰ 3	132	3	0	229-Ⅱ 3	245	4	0	229-Ⅲ 3	0	0	0
229-Ⅰ 4	125	0	0	229-Ⅱ 4	126	4	0	229-Ⅲ 4	0	0	0
229-Ⅰ 5	121	1	0	229-Ⅱ 5	154	13	0	229-Ⅲ 5	0	0	0
229-Ⅰ 6	130	8	0	229-Ⅱ 6	347	2	0	229-Ⅲ 6	0	0	0
229-Ⅰ 7	111	22	1	229-Ⅱ 7	138	8	0	229-Ⅲ 7	0	0	0
229-Ⅳ 1	181	0	0	229-Ⅴ 1	140	1	0	230-Ⅰ 1	297	0	0
229-Ⅳ 2	188	0	0	229-Ⅴ 2	137	1	0	230-Ⅰ 2	296	15	0
229-Ⅳ 3	191	3	0	229-Ⅴ 3	145	3	0	230-Ⅰ 3	337	6	0
229-Ⅳ 4	134	0	0	229-Ⅴ 4	147	3	1	230-Ⅰ 4	186	1	0
229-Ⅳ 5	130	0	0	229-Ⅴ 5	193	1	0	230-Ⅰ 5	455	1	0
229-Ⅳ 6	149	0	0	229-Ⅴ 6	193	1	0	230-Ⅰ 6	753	2	0
229-Ⅳ 7	129	0	0	229-Ⅴ 7	154	0	0	230-Ⅰ 7	248	1	0
230-Ⅱ 1	359	18	0	230-Ⅲ 1	1	16	2	230-Ⅳ 1	220	2	0
230-Ⅱ 2	293	6	0	230-Ⅲ 2	1	0	0	230-Ⅳ 2	188	7	0
230-Ⅱ 3	307	2	0	230-Ⅲ 3	0	0	0	230-Ⅳ 3	229	2	0
230-Ⅱ 4	181	4	0	230-Ⅲ 4	0	0	0	230-Ⅳ 4	298	3	0
230-Ⅱ 5	303	4	0	230-Ⅲ 5	0	0	0	230-Ⅳ 5	280	1	0
230-Ⅱ 6	436	6	0	230-Ⅲ 6	0	1	0	230-Ⅳ 6	292	0	0
230-Ⅱ 7	395	15	0	230-Ⅲ 7	1	0	0	230-Ⅳ 7	109	0	0
230-Ⅴ 1	580	4	0	231-Ⅰ 1	224	4	0	231-Ⅱ 1	156	0	0
230-Ⅴ 2	600	0	0	231-Ⅰ 2	258	2	0	231-Ⅱ 2	216	10	0
230-Ⅴ 3	727	3	0	231-Ⅰ 3	240	3	0	231-Ⅱ 3	284	0	0
230-Ⅴ 4	517	2	0	231-Ⅰ 4	129	0	0	231-Ⅱ 4	152	1	0
230-Ⅴ 5	447	0	0	231-Ⅰ 5	209	0	0	231-Ⅱ 5	238	4	0
230-Ⅴ 6	527	3	0	231-Ⅰ 6	227	0	0	231-Ⅱ 6	244	0	0
230-Ⅴ 7	580	1	0	231-Ⅰ 7	148	3	0	231-Ⅱ 7	201	7	0
231-Ⅲ 1	0	0	0	231-Ⅳ 1	196	1	0	231-Ⅴ 1	170	1	0
231-Ⅲ 2	0	0	0	231-Ⅳ 2	182	0	0	231-Ⅴ 2	130	1	0
231-Ⅲ 3	0	0	0	231-Ⅳ 3	192	0	0	231-Ⅴ 3	173	1	0
231-Ⅲ 4	4	0	0	231-Ⅳ 4	119	0	0	231-Ⅴ 4	100	2	0
231-Ⅲ 5	0	0	0	231-Ⅳ 5	192	0	0	231-Ⅴ 5	113	0	0
231-Ⅲ 6	0	0	0	231-Ⅳ 6	195	0	0	231-Ⅴ 6	120	1	0
231-Ⅲ 7	0	0	0	231-Ⅳ 7	116	0	0	231-Ⅴ 7	119	1	0

表中编号解释: 以 230-Ⅱ 4为例,230——无锡市郊梅园区菜地土,2——采集的土样于 50℃高温处理 1 h(第一阶段预处理之第 2种方法),4——第二阶段预处理之第 4种方法.其它编号以此类推.

由表 2可见,第一阶段预处理的 5种方法中,采集的土样不作处理时细菌菌落较多;采集的土样 120℃高温处理 1 h后,放线菌和真菌、细菌一样耐受不了高温而死亡,这样的处理也就失去了意义;28℃风干 10 d与 28℃风干 20 d的分菌效果差不多,而它们与“采集的土样 50℃高温处理 1 h”比较,细菌菌落数显著减少. Cross^[5]曾经指出,细菌对干燥比较敏感,而放线菌(尤其是孢子放线菌)较耐干燥.显然,土样风干处理后土样中水份的丢失使大部分细菌失去了生命力.

第二阶段预处理的 7 种方法中,以第 3 种方法和第 6 种方法的分菌效果比较好.

2.3 采样后 4℃ 条件下贮藏 1 个月再进行同样的预处理的分菌效果

这个试验的目的在于观察已放置冰箱 1 个月后的土样是否与新鲜土样在分离放线菌方面

有同样的价值.处理结果见表 3.

表 3 采样后 4℃ 条件下贮藏 1 个月后再进行预处理的分菌效果

编 号	放线菌	细菌	真菌	编 号	放线菌	细菌	真菌	编 号	放线菌	细菌	真菌
229-Ⅰ 1	180	连片	0	229-Ⅱ 1	213	连片	3	229-Ⅲ 1	0	0	0
229-Ⅰ 2	177	连片	6	229-Ⅱ 2	160	连片	4	229-Ⅲ 2	1	0	0
229-Ⅰ 3	187	连片	3	229-Ⅱ 3	183	63	1	229-Ⅲ 3	1	0	0
229-Ⅰ 4	223	连片	4	229-Ⅱ 4	203	连片	3	229-Ⅲ 4	6	193	2
229-Ⅰ 5	167	连片	6	229-Ⅱ 5	243	连片	1	229-Ⅲ 5	6	0	0
229-Ⅰ 6	227	连片	5	229-Ⅱ 6	260	43	8	229-Ⅲ 6	1	3	1
229-Ⅰ 7	137	连片	4	229-Ⅱ 7	140	63	2	229-Ⅲ 7	0	0	0
229-Ⅳ 1	133	4	0	229-Ⅴ 1	121	6	0	230-Ⅰ 1	413	连片	2
229-Ⅳ 2	161	3	0	229-Ⅴ 2	117	9	0	230-Ⅰ 2	438	连片	13
229-Ⅳ 3	162	3	0	229-Ⅴ 3	129	7	0	230-Ⅰ 3	420	连片	12
229-Ⅳ 4	130	9	0	229-Ⅴ 4	83	16	0	230-Ⅰ 4	333	连片	14
229-Ⅳ 5	132	5	0	229-Ⅴ 5	143	6	0	230-Ⅰ 5	370	连片	14
229-Ⅳ 6	148	6	0	229-Ⅴ 6	181	6	0	230-Ⅰ 6	380	连片	10
229-Ⅳ 7	95	7	0	229-Ⅴ 7	28	22	0	230-Ⅰ 7	250	连片	15
230-Ⅱ 1	533	52	0	230-Ⅱ 1	0	0	0	230-Ⅳ 1	598	18	0
230-Ⅱ 2	560	38	0	230-Ⅱ 2	0	0	0	230-Ⅳ 2	561	10	0
230-Ⅱ 3	590	55	7	230-Ⅱ 3	1	0	0	230-Ⅳ 3	602	16	0
230-Ⅱ 4	360	55	2	230-Ⅱ 4	0	1	1	230-Ⅳ 4	493	15	0
230-Ⅱ 5	203	46	8	230-Ⅱ 5	1	1	0	230-Ⅳ 5	541	10	0
230-Ⅱ 6	272	35	4	230-Ⅱ 6	1	12	1	230-Ⅳ 6	552	12	0
230-Ⅱ 7	183	57	9	230-Ⅱ 7	2	0	0	230-Ⅳ 7	450	31	0
230-Ⅴ 1	521	30	0	231-Ⅰ 1	160	155	14	231-Ⅱ 1	143	59	11
230-Ⅴ 2	529	20	0	231-Ⅰ 2	157	65	14	231-Ⅱ 2	165	39	8
230-Ⅴ 3	522	26	0	231-Ⅰ 3	163	41	16	231-Ⅱ 3	173	30	14
230-Ⅴ 4	522	30	0	231-Ⅰ 4	198	35	14	231-Ⅱ 4	250	17	0
230-Ⅴ 5	545	8	0	231-Ⅰ 5	210	34	20	231-Ⅱ 5	220	30	9
230-Ⅴ 6	555	17	0	231-Ⅰ 6	191	24	5	231-Ⅱ 6	263	18	0
230-Ⅴ 7	252	35	0	231-Ⅰ 7	122	168	1	231-Ⅱ 7	127	33	1
231-Ⅲ 1	1	1	1	231-Ⅳ 1	122	4	0	231-Ⅴ 1	153	7	0
231-Ⅲ 2	1	0	0	231-Ⅳ 2	151	2	0	231-Ⅴ 2	80	3	0
231-Ⅲ 3	1	0	0	231-Ⅳ 3	188	3	0	231-Ⅴ 3	137	29	0
231-Ⅲ 4	1	2	0	231-Ⅳ 4	160	2	0	231-Ⅴ 4	72	6	0
231-Ⅲ 5	1	0	0	231-Ⅳ 5	136	1	0	231-Ⅴ 5	87	5	0
231-Ⅲ 6	7	1	0	231-Ⅳ 6	166	4	0	231-Ⅴ 6	99	5	0
231-Ⅲ 7	0	0	0	231-Ⅳ 7	84	2	0	231-Ⅴ 7	19	10	0

试验发现所有的处理结果中细菌菌落数均显著增加,尤其是第一阶段预处理采用“采集的土样不作处理”时细菌菌落在平板培养基上连成一片,已无法挑菌.这主要是由于土样密封保藏在 4℃ 条件下,土壤中的高含量的水分状况有利于细菌的繁殖而致. 231 号土样由于水分含量低而致平板培养基上细菌相对较少也说明了这一点.

分菌效果相似于 2.2 的试验结果,即 28℃ 风干 10 d 与 28℃ 风干 20 d 的分菌效果差不多,而且比“采集的土样 50℃ 高温处理 1 h”的细菌菌落数显著减少.

第二阶段预处理的 7 种方法中,亦以第 3 种方法和第 6 种方法的分菌效果比较好.

3 结 语

根据本文中的研究结果,作者建议选择性分离放线菌的一般方法为:采集的土样在 28℃或室温条件下风干 10~20 d后,将土壤悬浮液(10^1)在 40℃和 pH7的条件下,加 6%酵母膏和 0.05% SDS(5 mmol/L磷酸缓冲液),震荡 20 min,水稀释至 10^2 ;或土壤悬浮液(10^1)在 50℃和 pH7的条件下,加 6%胨和 0.05% SDS(5 mmol/L磷酸缓冲液),震荡 10 min,水稀释至 10^2 .然后用平板稀释法接菌于高氏合成 1号琼脂+重铬酸钾(质量浓度为 250 mg/L)的平板培养基上,培养 7 d后挑菌分离.

参考文献:

- [1] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1975.11~12
- [2] 杨宇容,徐丽华,李启任等.放线菌分离方法的研究[J].微生物学通报,1995,22(2):88~91
- [3] 野野村·英夫.选择性分离土壤放线菌的新方法[J].国外医药抗生素分册,1989,10(5):326~329
- [4] LADISLAV J H, RONDA D S. Methods for Isolation of Streptovercillia from Soils[J]. *J Antibiot*, 1988,41(4):576~578
- [6] CROSS T. Actinomycetes: A Continuing Source of New Metabolites[J]. *Dev Indust Microbiol*, 1982, 23:1~18

Selective Isolation of *Actinomycetes*

XU Cheng-yong, YU AN Ye, LI Dan-hui, XIA Huan-geng, ZHUGE Jian

(School of Bioengineering, Wuxi University of Light Industry, Jiangsu Wuxi 214036)

Abstract The studies on pretreatment of soil samples were conducted. The optimum concentration of the inhibitor $K_2Cr_2O_7$ in the plate medium was studied. Results show that the suitable method of the selective isolation of actinomycetes is that, after the collected soil samples are dried at 28℃ or at indoor temperature for 10 to 20 days, the soil suspension(10^1) added with 6% yeast extract and 0.05% SDS (5 mmol/L phosphate buffer) is stirred at 40℃, pH7 for 20 minutes, or the soil suspension(10^1) added with 6% peptone and 0.05% SDS (5 mmol/L phosphate buffer) is stirred at 50℃, pH7 for 10 minutes, then the colonies of actinomycetes is picked out from the agar medium after the soil suspension diluted with water to 10^2 is inoculated with the method of plate dilution on the Gause's starch agar added with 250 mg $K_2Cr_2O_7$ /L medium for 7 days.

Key words *actinomycetes*; method of isolation; pretreatment; inhibitor