

在无氮培养基中生长的放线菌的研究

I. 地理生态分布及其抗菌性能

翁繩周 姚炳新

(廈門大学生物学系, 廈門)

放线菌能否固氮, 各学者持有不同看法: 一些土壤微生物学者, 如 Beijerinck^[1]、Waksman^[2] 以及 Красильников^[3] 等认为, 土壤中放线菌不能固氮; 但是, 也有一些学者如 Plothe^[4]、Паносян^[5] 和 Metcalfe^[6] 等认为, 在土壤放线菌中有少数菌株具有固氮性能。

为了确定土壤中的放线菌能否固氮, 固氮放线菌的数量, 以及固氮的生理学条件。Федоров 等^[7-9]进行了系列的实验, 结果指出, 有不少的放线菌能够固氮。

直接应用无氮培养基分离放线菌, 研究在无氮培养基中生长的放线菌的地理生态分布, 文献上尚未见到报告; 至于具有这种生理特点的放线菌, 是否具有抗菌性能, 还没有学者作过探讨。我们相信, 研究这种生理特性的微生物的抗菌性能, 对了解形成抗菌物质的生物学意义、物质基础、拮抗物质的本质以及发现新的抗菌物质, 都有其一定的作用。

本文企图研究在无氮培养基中生长的放线菌的地理生态分布, 观察这些放线菌的抗菌性能, 为此采集了福建闽南地区的土壤进行试验。

材料及方法

土壤标本是采自福建仙游、惠安、同安、诏安以及廈門等地区的表层下1厘米的表土。廈門地区的土壤是我们着重研究的对象。取样时考虑到耕地、未耕地、贫瘠或肥沃等类型中, 能在无氮培养基中生长的放线菌的分布概况。为此, 我们选定四个点进行研究, 同时各个点皆重复分析3—4次。这四个点的土壤是: 1. 海边砂土: 土壤主要由海沙冲积成的, 距高潮区约有20米, 土壤贫瘠, 新垦地, 种植甘薯, 植物生长差; 2. 弱砾质砂壤土(以下简称为二号土); 土壤是由花岗岩风化成的, 贫瘠, 新垦地, 前作也是种植甘薯; 3. 菜园地: 是肥沃的壤土, 前作是种植蔬菜; 4. 山坡上砾质砂土: 成土母质和前述的弱砾质砂壤土相同, 由于是坡积的土壤, 不能持水故较干燥, 贫瘠, 是长耐旱植物的荒地。

土壤放线菌的分离按 Pochon 法^[10]。每样土壤分离2—3皿, 在28℃温箱中培养6—7天后进行计数。

放线菌在无挥发性氮及氧化氮环境中生长的证明, 按 Федоров 等的方法^[7]。挥发性氮及氧化氮的吸收剂是用10%硫酸及碱性高锰酸钾。

无氮培养所用的容器, 皆经过洗液清洗, 避免在玻璃容器上沾染有含氮的物质。在无氮培养之证实实验中, 应用的蒸馏水是无氮蒸馏水。

我们应用的无氮培养基是根据 Александров^[11]的配方基础上修改的, 其组成是: 蔗糖(A. R.) 0.5%; K_2HPO_4 (C. P.) 0.03%; $MgSO_4$ (A. R.) 0.03%; $FeCl_3$ (A. R.), 少量; $CoCl_2$ (A. R.), 每

本文承王岳教授、金德祥教授、赵修谏教授等的指导, 特此致谢。

本文为中国微生物学会1963年学术年会转稿。

100 毫升培养基含 50 微克。自然 pH。固体培养基是加 2% 洗过的琼脂。另外,我们也选用了 Федоров 无氮培养基^[12]与这个培养基进行比较。

为了比较土壤中放线菌在无氮培养基中和其他分离培养基中生长的数量,我们选择淀粉 铵 培养基^[13]、克氏 1 号培养基^[14]和葡萄糖酪素培养基^[15]进行计数比较。

土壤 pH 的测定以比色法^[16];腐殖质含量的测定按丘林法^[16];含水量的测定是将土样在 105℃ 烘干至恒重。

糖的测定按 Somogyi 等的碘量法^[17];总氮的测定按凯氏微量定氮法^[18]。

用琼脂块法^[19]及孔碟法^[20]测定放线菌的抗菌力。抗菌试验的培养是先在冰箱中放置两小时,再置于温箱中培养 24 小时,然后测量抑菌的大小。试验菌种是八迭球菌 (*Sarcina lutea* T₁₀₀₁)。

证明在无氮中生长的放线菌,培养在马铃薯营养琼脂上能否形成抗菌物质,这培养基的组成为:麦芽糖 2%;蛋白胨 0.3%;肉膏 0.5%;马铃薯 20% (重量/体积,制成浸液);pH 7.2。

结 果

(一) 无氮培养的证实试验

我们自无氮培养基中分离的放线菌,选择数株直接以少量孢子接种在盛 25 毫升无氮液体培养基的 250 毫升三角瓶中,在 28℃ 温箱中培养 20 天后测定总氮及糖的消耗 (表 1)。结果指出,不同放线菌在培养中累积的氮量分别自 0.09 毫克至 0.36 毫克。这个结果与 Федоров 等的报告很是一致^[7-8]。

表 1 数株放线菌的固氮能力

菌 株	消耗糖的量 (毫克/25毫升)	固定氮的量 (毫克/25毫升)	消耗 1 克糖固定的氮量 (毫克)
1017	56.0	0.09	1.61
1206	70.3	0.16	2.27
1216	47.5	0.11	2.32
1227	82.5	0.12	1.45
2415	90.2	0.36	3.99
2418	69.3	0.27	3.9
2037	48.9	0.22	4.5
4207	27.8	0.15	5.4

为了证明氮的累积是分子态氮来的,抑是空气中氨或氧化氮来的。我们取 1227 号菌株的孢子悬液及厦门弱砾质砂壤土 (以下简称二号土) 的土壤悬液,分别无氮培养基中进行分离,然后分为两组,一组是按 Федоров 等所设计的无挥发性氨及氧化氮环境下培养,另一组是直接置于温箱中培养,作为对照。经证明,在 28℃ 培养五天,两者的计数基本相同 (表 2)。

表 2 在无挥发性氨及氧化氮和在大氣中培养放线菌的分离数的比较

试 样	在无挥发性氨及氧化氮中培养的菌数	在大气中培养的菌数
二号土	36	40
1227	236	256

(二) 在无氮培养基中生长的放线菌的地理生态分布

当研究在无氮中生长的放线菌的地理生态分布时, 必须考虑到: 在无氮琼脂平皿上分离得到的放线菌的计数, 能否代表这些放线菌存在的真实情况。为此我们以无氮培养基分离厦门四号的土壤, 培养五天后, 挑取在形态上有区别的不同菌落的菌丝, 接种在无氮液体培养基中进行培养。结果指出, 这些放线菌皆能正常地生长, 连续传代也不失其生命力和原始形态学的特征。结合上面关于在无挥发性氨及氧化氮中放线菌的分离株数的实验。我们深信, 直接在无氮琼脂上生长的放线菌的计数, 可以作为这些放线菌的分布的指标。

表 3 土壤中的放线菌在不同培养基中的分离数的比较
(单位: 10^6 个/每克土)

土 号*	土 壤 性 质			培 养 基			
	pH	腐殖质%	含水量%	无 氮	葡萄糖酸素	淀 粉 铵	克氏 1 号
I	7.6	0.66	1.88	32	111	69	72
II	7.6	0.89	2.27	36	65	69	70
III	6.4	1.32	8.60	90	160	150	120
IV	7.8	1.03	2.13	73	321	221	190

* I. 厦门海边沙土; II. 厦门弱砾质砂壤土; III. 厦门菜园土; IV. 厦门山坡上砾质砂土。

由表 3 表明, 在厦门地区四种不同土壤, 在无氮培养基中出现放线菌的数量, 比一般分离培养基中出现的数量少。这种数量上的差别, 可能说明, 在无氮培养基中生长的放线菌, 比其他氮素营养型的数量少。

另外, 在无氮培养基中放线菌的计数, 因土壤的特性不同而不同。看来, 放线菌的计数, 与土壤的 pH 及含水量不成一定的关系; 与土壤腐殖质的含量有一定的关系。例如菜园土中的腐殖质最高, 则菌数最多; 山坡上弱砾质砂土中的腐殖质次之, 则菌数相对地减少; 海边砂土中的腐殖质最少, 因此菌数最低。这种数量变化的规律也可以从表 4 的结果看出。Мишустина^[21] 在其实验中指出, 微嗜氮微生物在富含腐殖质的表层土壤中最多。我们的结果与她的报告相符合。

表 4 同安数地土壤的腐殖质含量与在无氮中生长的放线菌的数量的关系
(单位: 10^6 个/每克土)

土 号	采 样 地 点	土 壤 性 质		菌 数
		pH	腐殖质(%)	
同 1	汀溪水库山上, 红壤壤土, 荒地, 芒箕骨地土。	6.8	1.12	14.5
同 2	汀溪水库附近山上, 红壤壤土, 菠萝密地土。	6.2	1.28	18
同 3	近城关的山坡下的梯田, 水稻土, 现作大豆。	6.6	1.42	34
同 4	近城关, 由溪流冲积的水稻土, 现作豌豆。	6.6	1.57	36
同 5	近城关, 由溪流冲积的水稻土, 现作蔬菜。	6.8	—	62

注: 风干土。

关于在无氮中生长放线菌分布的普遍性问题,我们又调查了仙游、惠安及诏安等地的土壤,实验结果指出,所有土壤皆有在无氮中生长的放线菌的分布(表 5)。

表 5 閩南一些地区的土壤中在无氮中生长的放线菌的分布
(单位: 10^5 个/每克土)

土 号	采 样 地 点	土 壤 pH	菌 数
仙 1	仙游虎秀山山坡下红壤壤土,蔗田土。	6.4	116
仙 2	仙游城关,冲积土,半熟地,蔗田土。	6.6	35
仙 3	仙游城关,冲积土,熟地,菜园土。	6.6	50
惠 1	惠安城关,红壤壤土,甘薯地土。	6.4	94
诏 1	诏安永头,红壤沙壤土,咖啡园土。	6.2	90

(三) 在无氮培养基中生长的放线菌的抗菌性能

在无氮培养基中生长的放线菌,到底有无抗菌性能,是我们注意的中心。为此,我们进行了以下几个实验。

首先,我们取厦门二号土,分别在淀粉铵琼脂、Федоров 无氮琼脂以及我们所拟定的以葡萄糖及蔗糖为碳源的无氮琼脂上进行分离,在 28°C 培养 7 天后,挖取在平皿上生长的不同的单独菌落的琼脂块(块的大小按菌落的大小),以移块法进行抑八选球菌的试验。结果指出(表 6),在这些培养基中生长的放线菌对八选球菌的抗菌率尚高。同时,抗菌的活性也很强。在 Федоров 无氮培养基中分离出来的放线菌中,就有一株的抑菌环达 33 毫米。

从我们多次的实验中证明:取自生长在无氮葡萄糖培养基上的菌落琼脂块的抗菌率,比自无氮蔗糖培养基上的菌落琼脂块的抗菌率高。这可能是,在无氮培养基中,蔗糖是不适于形成抗菌物质的碳源。因此我们认为,在无氮培养基中,以葡萄糖为碳源,对观察土壤中放线菌的抗菌率较佳,以蔗糖为碳源,对快速发现产生抗菌物质的抗生素可能较便。

表 6 应用不同的培养基分离的放线菌的抗菌率

无氮培养基		菌数 ($\times 10^5$ 个/每克土)	试验株数	抑八选球菌活性(毫米)				抗菌株数	抗菌率 (%)
				30	20—30	10—20	10以下		
碳源	葡萄糖	36	18	—	1	9	3	13	72
	蔗糖	40	17	—	1	1	5	7	41
淀粉铵培养基		60	17	—	—	—	4	4	23.5
Федоров 无氮培养基		39	18	1	4	5	1	11	61

我们又取各种土壤,在无氮培养基及淀粉铵培养基上进行分离,取不同的单独的菌落琼脂块,以同样方法进行抑八选球菌试验,结果指出(表 7),在各种土壤中,都有在无氮培养基中生长的拮抗放线菌。在大部分的土壤中,这些抑八选球菌的比率达 50—60%。抗

菌率的高低与土壤的肥沃度以及耕作之间不能找出相关的关系。

表 7 不同土壤中的放线菌在无氮及淀粉铵培养基中的抗菌率的比较

土 号*	培 养 基**	试 验 株 数	抗 菌 株 数	抗 菌 率 (%)
仙 2	1	10	10	100
	2	—	—	—
仙 3	1	16	14	87.5
	2	13	6	46
同 1	1	16	11	62.5
	2	15	11	66.7
同 2	1	11	6	54.5
	2	10	7	70.0
同 3	1	8	1	12.5
	2	3	1	33.3
同 4	1	8	8	100
	2	2	2	100
同 5	1	14	9	64.3
	2	9	7	77.8

* 土壤特征见表 4, 5。

** 1 示无氮培养基; 2 示淀粉铵培养基。

为了进一步证明: 分离在无氮培养基中的放线菌, 能否在无氮液体培养基中形成抗菌物质, 因此我们将生长在无氮固体培养基中的放线菌, 接种在盛无氮液体培养基的试管中, 进行斜置培养, 在 28℃ 温箱中培养一周, 取培养液, 以孔碟法行抑八选球菌试验, 结果指出(表 8), 少数菌株在无氮液体培养基中也能形成抗菌物质, 其中有个别菌株抑菌的抑菌环达 15 毫米。另外, 我们从其他实验的土壤中, 分离一株放线菌, 其无氮液体培养液的抑菌环达 20 毫米。

表 8 不同土壤中的放线菌在无氮液体培养液的抑八选球菌活性

土 号*	试 验 株 数	抗 菌 活 性 (毫 米)		
		10—15	8—10	微 小
I	18	1	—	—
II	20	1	1	11
III	12	—	1	2
IV	16	—	1	4

* 土壤的特征见表 3。

关于在无氮培养基中能够形成抗菌物质的放线菌, 接种在马铃薯琼脂上能否形成抗菌物质, 我们也进行了观察。结果指出, 大多数菌株在无氮培养基中能形成抗菌物质, 在马铃薯琼脂上也能形成抗菌物质; 但有部分菌株, 在无氮培养基中形成抗菌物质, 在马铃薯琼脂上不显抗菌性能。

另外, 我们也观察了, 放线菌在无氮培养基中连续传代培养, 对抗菌性能及形态学特征有否变化。观察结果: 大多数菌株经连续传代培养一年以上, 没有发现抗菌性能消退的现象, 至于放线菌基质菌丝的颜色、气生菌丝的形态和颜色以及形成色素的能力, 也未

见到有明显的变化。

討 論

总括以上的实验指出: 土壤中有许多放线菌, 在无氮培养基中连续培养, 能正常地生长, 累积少量的氮素; 另外, 有不少菌株, 在无氮液体培养基中或固体培养基中, 形成抗菌物质。从放线菌在这些生理学上的反应来看, 放线菌在无氮培养基中的生活, 是积极的、主动的。但是, 我们为何不称这些放线菌为固氮菌呢? 原因是: 这些放线菌在无氮培养基中生长, 比在含氮培养基中生长较差, 同时固氮力较弱, 是有区别于一般的固氮细菌。根据微嗜氮微生物的特性^[22], 我们所分离的这些放线菌, 应属于微嗜氮放线菌。

无氮中生长的放线菌, 一般在肥沃的土壤中比较多。这种分布规律, 是否因生物种间营养竞争的选择的结果; 或是因土壤碳源存量的关系; 或是其他生态因子的影响, 尚不得而知。从我们初步的观察(数据尚未发表), 碳源可能不是唯一的限制因子。

从无氮中生长的放线菌的广泛分布, 我们有理由相信, 在土壤中可能有强的固氮性能的放线菌, Федоров 等获得一株放线菌, 在 25 毫升的无氮液体培养基中, 固氮达 1.44 毫克即是一个例子。但是, 进行固氮放线菌的研究, 需要研究一个适用的培养基配方。我们修改 Александров 的培养基的配方, 主要是考虑以下几个方面: 1. 减少 K_2HPO_4 的量, 是使培养基达中性, 不必另行调节 pH; 2. 降低硫酸镁的量, 使含氮的杂质减少, 因为在一般化学纯的硫酸镁中, 皆含有微量的氨; 3. 加氯化钴是为刺激孢子的形成^[23], 便于鉴别菌落的特征。但是我们的培养基对放线菌的固氮作用, 还未作深入的比较研究。Федоров 无氮培养基的配方复杂, 不好用, 同时对菌的生长度来看, 不比我们的配方好。

引起我们对无氮生长的放线菌的研究兴趣, 首先是我们要了解, 抗菌物质的形成与存在于土壤中的放线菌的生理及生态间有何联系。例如, Chun^[24] 在无沥青马路边分离的放线菌的抗菌率最高; 有不少的研究者指出, 在富含有机质及耕地中的拮抗菌较多^[25]; 有人认为, 青霉素的形成是一种生物的解毒作用^[26]; 革兰氏杀菌素 C, 是蛋白质及氨基酸合成中所形成的物质^[27]等一系列问题的内在与外在的关系。

从我们初步观察证明, 无氮生长的放线菌, 有不少菌株具有抗菌性能。但是, 1. 无氮生长的放线菌的具抗菌性能与其无氮生长的生理有何联系, 是如何联系的; 2. 在无氮中形成的抗菌物质是否简单的低分子物质; 3. 少数菌株只能在无氮中形成抗菌物质, 在有机氮中不形成抗菌物质, 这对发现新的抗菌素是否提供线索。关于这些方面都有待于进一步证明。

从无氮中分离的所有放线菌, 它们的生活力皆很强, 因此筛选在无氮中生长的拮抗放线菌, 作为农用上的饼土抗生素, 可能有其优越之处。

結 論

在各种土壤中皆有在无氮中生长的放线菌的分布, 这些放线菌是属于微嗜氮放线菌, 它们一般在肥沃的土壤中较多。微嗜氮的放线菌, 有不少的菌株具有抗菌性能, 有少数菌株在无氮培养基中形成抗菌物质, 在含有机氮培养基中不形成抗菌物质。

参 考 文 献

- [1] Beijerinck, M. W.: *Mikroben. Centrbl. Bakt.*, II. 6:2—12, 1900.
- [2] Waksman, S. A.: *The Actinomycetes*, Vol. I. Bailliere and Cox Ltd., 1959.
- [3] Красильников, Н. А.: *Лучистые грибки и родственные им организмы*, М., 1938.
- [4] Plotho, O.: *Arch. Mikrobiol.* 11:33—72, 1940, Cited in B. A. 15:15238, 1941.
- [5] Паносян, А. К. и др.: Докл. АН Арм ССР, 2: 3. см. Федоров, М. В. и Кудряшева, Т. К.: Докл. АН СССР, 108: 345—348, 1956.
- [6] Metcalf, G. and Brown, M. E.: *J. Gen. Microbiol.* 17:567—572, 1957.
- [7] Федоров, М. В. и Кудряшева, Т. К.: Докл. АН СССР, 108: 345—348, 1956.
- [8] Федоров, М. В. и Ильина, Т. К.: *Микробиол.* 28: 541—547, 1959.
- [9] Федоров, М. В. и Ильина, Т. К.: *Микробиол.* 29: 495—500, 1959.
- [10] Pochon, J.: *Manuel Technique D Analyse Microbiologique Du Sol*, Masson et Cie editeurs, 1954. 闾逊初译: 土壤微生物学分析技术手册, 科学出版社, 1957.
- [11] Александров, В. Г.: Силикатные бактерии, Сельхозгиз, 叶维青译: 矽酸盐细菌, 科学出版社, 1955.
- [12] Федоров, М. В.: *Микробиол.* 14: 94—105, 1945.
- [13] 中国科学院药物研究所: 抗菌素实习筛选讲义, 1959.
- [14] Красильников, Н. А.: *Актиномицеты-антагонисты и антибиологические вещества*, М., 1950.
- [15] Jensen, H. L.: *Soil Sci.*, 30:19—77, 1930.
- [16] 李庆远、鲁如坤、陈家坊: 土壤分析法, 科学出版社, 1958.
- [17] Shaffer, P. A. and Somogyi, M.: *J. Biol. Chem.* 100:695—713, 1933.
- [18] Белозерский, А. Н. и др.: Практикум по биохимии растений 1951. 曹宗巽、顾孝诚、吴相钰译: 植物生物化学实验指导, 高等教育出版社, 1956.
- [19] Егоров, Н. С.: *Выделение микробов-антагонистов и биологические методы учета их антибиологической активности*, Издательство Московского Университета, 1957.
- [20] 上海医药工业研究所: 抗菌素工业分析, 化学工业出版社, 1960 (并参考有关文献)。
- [21] Мишустина, И. Е.: *Труды Инсти. Микробиол.* 4: 110—129, 1955.
- [22] 姜隆后等编: 微生物在土壤养分转化中的作用, 科学出版社, 1962.
- [23] Hickey, R. J. and Tresner, H. D.: *J. Bact.* 64:891—892, 1952.
- [24] Chun, D.: *Antibiotics and Chemotherapy*, 6:324—329, 1956.
- [25] Гаузе, Г. Ф.: *Пути изыскания новых антибиотиков*, Изд. АН СССР, 1958.
- [26] Левитов, М. М.: 青霉素族抗菌素的生物合成, 引自抗菌素演讲集, 人民卫生出版社, 1960.
- [27] Жарикова, Г. Г., Силаев, А. Б. и Супикова, И. В.: *Антибиотики*, 8: 425—430, 1963.

STUDIES ON THE ACTINOMYCES GROWN ON NITROGEN-FREE MEDIUM

I. ECOLOGICAL DISTRIBUTION AND ANTAGONISTIC PROPERTIES

WENG SHEN-CHOU AND YIAO BING-XIN

(Dept. of Biology, Amoy University, Amoy, Fukien)

This paper presents the results of studies on the ecological distribution and antagonistic properties of the actinomycetes, which can be grown on nitrogen-free medium.

For studying the ecological distribution of these actinomycetes, soil samples were collected from Xian-you, Hui-an, Tong-an, Amoy and Zhao-an of the Southern Fukien and plated on nitrogen-free medium to count the numbers of colonies. The results indicated that the actinomycetes grown on nitrogen free medium widely distributed in all soils and were more abundant in the fertile soils.

In order to study the antagonistic properties of these actinomycetes, the different actinomycetes colonies, which grown on plates of the nitrogen-free medium for 5—7 days, were cut as agar blocks to test their antibacterial activities. It was shown that 50—60% isolates in most soil samples exhibited antibacterial action against *Sarcina lutea* T₁₀₀₁. It is noteworthy to indicate that some of the actinomycetes which were grown on nitrogen-free medium showed antibacterial properties but these properties were lost when they were grown on organic nitrogen medium.