

# *Actinobacteria* 的分离与鉴别

余利岩 姚天爵

(中国协和医科大学中国医学科学院医药生物技术研究所 北京 100050)

**摘要:** *Actinobacteria* classis nov. 一般包括具有超过 50% G + C 的 DNA 碱基组成的微生物。实验中在分土培养基中, 添加了 Nalidixic acid 及 Aztreonam 和 Benlate, 从 4 份土壤样品中, 共分离得到 64 株细菌, 革兰氏阳性细菌共计 56 株, 占所分离菌株的 87.5%。任意挑选其中的革兰氏阳性细菌, 选用以高 G + C 含量革兰氏阳性细菌为靶点的 PHGC 探针及 PNHGC 对照探针, 并联合使用我们自行设计的适用于 *Actinobacteria* 的 PA-1 和 PA-2 探针进行初筛菌株的鉴别。综合 4 种探针的 FISH 的结果, 我们可以判定在 31 株分离株中, 有 22 株 *Actinobacteria*, 6 株低 G + C 含量革兰氏阳性细菌, 其它 3 株则不易判定。DNA G + C 含量的测定结果表明, 所建立的 FISH 方法可作为鉴别 *Actinobacteria* 的一种手段, 它具有完整、准确和直观的优点。

**关键词:** *Actinobacteria* 革兰氏阳性高 G + C 含量细菌, 荧光原位杂交

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2001) 05-0036-06

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *ACTINOBACTERIA*

YU Li-Yan YAO Tian-Jue

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences  
Peking Union Medical College, Beijing 100050)

**Abstract:** The lineage-*Actinobacteria* class nov. comprises organisms with a DNA base composition which generally is above 50% G + C (with a few exceptions). We set up a method that has been used in isolating *Actinobacteria* and *Actinomycetes*. We added 25 $\mu$ g/mL Nalidixic acid and 25 $\mu$ g/mL Aztreonam into isolation media to inhibit the other bacteria and 20 $\mu$ g/mL Benlate to inhibit fungi. We used fluorescent in situ hybridization to identify *Actinobacteria*. Using the four probes, PA-1, PA-2, PHGC and PNHGC, we made the identification on the 31 strains of the 56 gram-positive bacteria randomly selected and got 22 positive results, 6 negative results and 3 ambiguous results. It was showed that the results of G + C content determination and FISH method were identical. Among 31 strain, there were 24 strains of *Actinobacteria*, the rate was 77.4%. This proved the isolation and FISH identification methods were effective and reliable.

**Key words:** *Actinobacteria*, Gram-positive, Fluorescent in situ hybridization

放线菌可产生丰富的次级代谢产物。目前,临床上使用的抗生素中有三分之二来自于放线菌。随着分子生物学方法分析系统进化关系研究的进展,发现革兰氏阳性球菌和杆菌如 *Micrococcus* 和 *Arthrobacter* 和放线菌属于系统进化树上的同一个分支,因此放线菌的领域也从“具有或至少是在生活周期中的一个阶段具有分支菌丝形态的革兰氏阳性菌”扩展到“高 G + C 含量的革兰氏阳性细菌”,目前统称为 *Actinobacteria classis nov.*<sup>[1]</sup>。

从系统进化树上可以看出, *Actinobacteria* 中的微生物具有一个共同的祖先,它们必然具有一定的生物共性,例如它们有产生与某一特殊相关分类单元中的微生物相似的特殊生物活性物质的能力。鉴于这一点,同时也考虑到用常规方法,从已进行过深入研究的放线菌中分离到新的有用的次级代谢产物的难度在日益增加,我们扩大了微生物筛选的研究对象,从以前的 *Streptomyces* 和 *Streptomyces* 以外的放线菌扩大到所有的 *Actinobacteria*。本文实验中的 *Actinobacteria* 将特指那些具有普通细菌形态的高 G + C 含量革兰氏阳性细菌。

目前,在微生物分子生态学研究中,以荧光标记的 rRNA 寡核苷酸为探针的荧光原位杂交 (Fluorescent in situ Hybridization FISH) 得到广泛的应用,主要用于鉴别和检测特定微生物的分布<sup>[2,3]</sup>。互补于多个水平系统进化单元的特征序列寡核苷酸探针已被成功地用于细菌的快速鉴别。如 Beimfohr, C.<sup>[4]</sup>等人用特异的探针,可以快速检测到牛奶样品中肠球菌和乳球菌的存在,这种方法可使人们在一天之内分析牛奶样品中的微生物群落,而常规的经过培养而后定性的方法常常是要花数天的时间。

FISH 方法的应用,使我们有可能对自然环境中的微生物群落进行真实的详细的了解。我们选择 FISH 方法作为鉴别 *Actinobacteria* 的同时,还有另外的设想,即利用多层次的探针,对环境中的 *Actinobacteria* 进行一定的研究,了解自然环境中 *Actinobacteria* 的分布,从而改进微生物的分离手段,有目的地去分离某些微生物,以提高分离到新的有用微生物的可能性。

# 1 材料与方法

## 1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器：见参考文献 [6]。

1.1.2 抗生素：所使用的抗生素参见表 1。

表 1 抗生素对不同微生物的 MIC 实验结果

Antibiotics	Gram-negative						Gram-positive					
	EC	PA	BS	ML	TT	LJ	AF	MM	MP	SA	SG	AP
Nalidixic acid	12.5	>100	3.12	>100	100	>100	100	100	25	100	>100	50
Novobiocin	100	100	<0.8	<0.8	3.12	50	<0.8	25	<0.8	12.5	3.12	25
Ampicillin	1.56	>100	50	<0.8	6.25	1.56	6.25	50	<0.8	>100	50	6.25
Streptomycin	12.5	25	<0.8	1.56	≤0.8	1.56	<0.8	1.56	<0.8	≤0.8	>100	<0.8
Kanamycin	5	>100	<0.8	6.25	12.5	12.5	<0.8	25	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8
Neomycin	25	>100	<0.8	3.12	12.5	100	<0.8	6.25	<0.8	<0.8	3.12	<0.8
Erythromycin	12.5	>100	<0.8	≤0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	25	<0.8
Chloramphenicol	1.56	>100	3.12	1.56	1.56	1.56	1.56	1.56	<0.8	3.12	50	1.56
Rifampicin	>100	50	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	1.56	<0.8	<0.8
Trimethoprim	12.5	>100	12.5	50	>100	>100	>100	12.5	>100	100	>100	>100
Penicillin	12.5	>100	100	<0.8	3.12	1.56	<0.8	50	<0.8	50	50	<0.8
Aztreonam	≤0.8	25	100	25	>100	>100	>100	>100	12.5	>100	>100	>100

EC: *Escherichia coli*, PA: *Pseudomonas aeruginosa*, BS: *Bacillus subtilis*, ML: *Micrococcus luteus*, TT: *Terrabacter namescens*, LJ: *Luteococcus japonicus*, AF: *Aeromicrobium fastidiosum*, MM: *Microsphaera multipartite*, MP: *Microlunatus phosphovorus*, SA: *Streptomyces albus*, SG: *Streptomyces griseus*, AP: *Actinoplanes philipinensis*

1.1.3 培养基及其组成：胰酪豆胨培养液：胰酪豆胨培养基粉末 30g；蒸馏水 1L；pH7.3 ± 0.2。营养琼脂培养基：营养琼脂培养基粉末 23g；蒸馏水 1L；pH6.8 ± 0.2。R 琼脂培养基：细菌用蛋白胨 10g；细菌用酵母浸膏 5g；牛肉浸膏 5g；细菌用水解酪蛋白氨基酸 5g；细菌用小牛浸膏 2g；吐温 80 50mg；MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1g；Agar 10g；蒸馏水 1L；pH 7.2。

1.1.4 溶液的组成及配制：改进的 Winogradsky 溶液成份如下：K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.8g；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2g；MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.1g；NaCl 2.5g；Fe (SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>·nH<sub>2</sub>O 0.05g；MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.05g，蒸馏水 1L。

## 1.2 方法

1.2.1 微生物对药物敏感性实验：按照常规方法测定抗生素的最低抑菌浓度 MIC。

1.2.2 *Actinobacteria* 的分离：在 Water agar 固体培养基及 R agar 固体培养基中加入含有 Benlate, Nalidixic acid 及 Aztreonam 的抗生素溶液，使其终浓度分别为 Benlate 20μg / mL, Nalidixic acid 25μg / mL, Aztreonam 25μg / mL。

将 1g 土壤样品制成 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 土壤稀释液。各取 0.1mL，涂布于固体培养基平板上，27℃ 倒置培养。一周后，将细菌分离株移种到 R agar 固体培养基和 1/5 营养琼脂固体培养基斜面上，27℃ 培养后用肉眼或显微镜比较形态，除去相同的菌株。

1.2.3 革兰氏阳性菌的鉴定：按照 Live Baclight™ 细菌革兰氏染色试剂盒中的操作方法进行鉴定。

1.2.4 荧光原位杂交: 见参考文献 [6]。

1.2.5 DNA G + C 含量的测定: 见参考文献 [6]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *Actinobacteria* 的分离

为建立 *Actinobacteria* 的分离方法所进行的药物敏感性实验的结果如表 1 所示。Nalidixic acid 对大肠杆菌有作用, 但对 *Pseudomonas aeruginosa* 则没有什么作用, 但是它可抑制 *Bacillus subtilis*, 而对 *Actinobacteria* 则作用不明显。因此可以考虑将其作为 *Actinobacteria* 分离所采用的抗生素之一。Aztreonam 强烈抑制大肠杆菌, 对 *P. aeruginosa* 也有一定的抑制作用, 但对 *Actinobacteria* 则几乎没有影响。根据以上的结果及其以往的工作经验, 我们在培养基中加入对一些革兰氏阴性菌如大肠杆菌和低 G + C 含量革兰氏阳性细菌枯草杆菌有抑制作用的 Nalidixic acid 以及抑制大肠杆菌和绿脓杆菌等革兰氏阴性菌的 Aztreonam, 还有一直延用的抗真菌剂 Benlate 3 种抗生素, 用于分离 *Actinobacteria*。

我们力求所使用的抗生素能够抑制大部分革兰氏阴性细菌及某些低 G + C 含量革兰氏阳性细菌, 尽量减少抑制 *Actinobacteria* 的可能性, 以便我们有机会筛选到更多的这类细菌。

从 4 份土壤样品中, 共分离得到细菌 64 株。在实验过程中, 我们进行了  $10^{-6}$  土壤稀释液分离平板上的菌落计数, 可达到  $10^8 \sim 10^9$ , 较以前我们的分离菌数  $10^6 \sim 10^7$  有所增加。尽管我们并不排除有土壤样品之间的差异, 但仍可认为提高土壤的稀释倍数是提高分离效率的方法之一。在土壤样品中, 有着各种各样生理状态的细菌, 其中包括 ①人工培养条件下, 用肉眼可以确认的能增殖的细菌; ②维持分裂能力的细菌; ③失去分裂能力但改变条件, 有可能恢复分裂的细菌; ④已丧失分裂能力但维持生物活性的细菌; ⑤构造已遭到破坏的细菌。在这些细菌中, 可培养的细菌只能占到总细菌数的 1% ~ 10%。但即使在有可能培养的微生物中, 有时也会因所用培养条件达不到要求而不能分离。这些条件包括培养基的营养成分、浓度、pH、培养温度、菌群之间的拮抗作用、共生作用等。增大稀释倍数, 可在一定程度上缓解不同菌株之间的相互抑制作用, 因而可提高分离效率。

### 2.2 分离株的革兰氏染色特性的确定

用 Live Baclight™ Bacteria Gram Stain Kit 对分离得到的 64 株细菌进行革兰氏染色。这个试剂盒提供了确定活细胞革兰氏染色特性的荧光染色方法, 染色可一步完成。Live Bactight Bacterial Gram stain Kit 所采用的是绿色荧光的 SYTO®9 和红色荧光的 hexidium iodide 核酸染料。这两种染料在它们的光谱特性和标记活的革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌方面都有所区别, SYTO®9 标记活的革兰氏阴性细菌和革兰氏阳性细菌, 而 hexidium iodide 则标记活的革兰氏阳性细菌, 在革兰氏阳性细菌中, 两种染料都染色, 但 hexidium iodide 染色有效地取代 SYTO9 染色, 因此在合适的波长下, 革兰氏阴性细菌呈绿色荧光, 而阳性细菌呈红光。

从 64 个细菌株中, 共得到全部呈红色荧光的革兰氏阳性菌共计 56 株, 占 87.5%。由此可见, 平板分离时, 所选抗生素的加入对抑制革兰氏阴性菌是非常有效的。

### 2.3 *Actinobacteria* 分离株的鉴别

我们选用 Amann 设计的以高 G + C 含量革兰氏阳性细菌为靶点的 PHGC 探针及其对照 PNHGC 探针<sup>[5]</sup>进行 FISH 实验条件优化研究。并自行设计了适用于 *Actinobacteria* 的探针 PA-1 和 PA-2, 两个探针联合使用, 基本上可以检测出所有的 *Actinobacteria*, 标准菌株的 FISH 实验表明四种不同分类水平的探针是特异的, 所建立的 FISH 方法适用于所有使用的标准菌株, 具有高度的敏感性和特异性。

为了保证初筛的完整性及避免因细菌差异而造成的 FISH 结果的误差, 我们同时选用 PA-1、PA-2、PHGC 和 PNHGC 作为探针联合使用, 进行 *Actinobacteria* 的鉴别。从 56 株革兰氏阳性细菌分离株中任意挑选了 31 株菌进行了 FISH 的实验, *Actinobacteria* 分离株的鉴别结果如表 2 中所示。

表 2 分离株的 *Actinobacteria* FISH 鉴别实验结果及 G + C 含量

Strains	PA-1	PA-2	PHGC	PNHGC	GC content
K98B-151	++	++	++	-	64.29%
K98B-152	+	±~+	+	±	68.16%
K98B-153	--±	+	+	-	61.73%
K98B-154	±~+	+	+	±	65.07%
K98B-155	±~+	±~+	±~+	-	61.57%
K98B-156	-	±	-	++	50.44%
K98B-158	±~+	±~+	±~+	±	68.39%
K98B-162	±~+	±~+	--±	--±	67.72%
K98B-163	--±	--±	--±	+	36.80%
K98B-164	-	-	-	+	50.23%
K98B-165	+	+	+	-	67.30%
K98B-169	±~+	±	±~+	+	38.70%
K98B-170	±~+	±~+	±~+	±~+	55.18%
K98B-171	±~+	±~+	±	+	37.01%
K98B-172	+	+	+	-	66.60%
K98B-173	±	+	-	-	61.12%
K98B-175	--±	-	--±	--±	41.84%
K98B-176	±~+	+	+	±	70.54%
K98B-177	+	±~+	±	-	71.50%
K98B-178	-	±~+	±~+	-	66.40%
K98B-179	+	+	+	-	62.29%
K98B-180	+	±~+	-	-	52.34%
K98B-181	±~+	±	+	±	65.18%
K98B-182	+	+	±~+	--±	63.62%
K98B-185	±~+	+	+	-	60.30%
K98B-187	+	+	+	±	68.10%
K98B-188	--±	-	--±	+	46.26%
K98B-189	+	±~+	±~+	-	60.94%
K98B-190	+	±	±~+	-	63.20%
K98B-194	+	±~+	±~+	-	65.75%
K98B-196	+	+	±~+	-	71.30%

从表 2 中可以看出, 用 PA-1 作为探针有 23 个阳性结果, 准阳性结果 5 个, 阴性结果 3 个; 用 PA-2 作为探针时, 有 23 个阳性结果, 准阳性结果 6 个, 阴性结果 2 个; 而

PHGC 作为探针时, 有 21 个阳性结果, 6 个准阳性结果, 4 个阴性结果; 用 PNHGC 作为探针时, 6 个阳性结果, 10 个准阳性结果, 其余均是阴性结果。综合 4 种探针的 FISH 的结果, 我们可以判定在 31 株分离株中, 有 22 株 *Actinobacteria*, 如: K98-165, K98-172 等, 还有 3 株如 K98B-158 及 K98B-170, K98B-175 则不易判定, 有可能是 *Actinobacteria*, 而其它 6 株则为低 G+C 含量革兰氏阳性细菌。

## 2.4 FISH 鉴别实验可行性及准确性研究

G+C 含量实验表明, G+C 含量超过 50% 的菌株共有 26 株, 其中 K98B-156 和 K98B-164 的 G+C 的含量为 50.44%, 50.23%, 考虑到测定及计算时的误差, 认为可归为低 G+C 的革兰氏阳性菌。K98B-158、K98B-170 G+C 含量分别是 68.39%、55.18%, 为 *Actinobacteria*; K98B-175 的 G+C 含量为 41.84%, 则为低 G+C 含量的革兰氏阳性菌。这 3 株菌的 FISH 结果的不易判断可能与探针渗透到细胞壁的能力有关, 这还需要进一步的探讨。以上结果表明, FISH 的鉴别结果和 G+C 含量测定实验结果是一致的。因此, 我们所建立的 FISH 方法可作为鉴别 *Actinobacteria* 的一种手段, 并具有完整性、准确性、直观性的优点。

综上所述, 在我们从平板分离中得到的 64 株细菌中, 革兰氏阳性细菌为 56 株。而在我们任选的 31 株革兰氏阳性细菌中, 有 24 株为 *Actinobacteria*, 其比例为 77.4%, 这同时也表明, 我们建立的 *Actinobacteria* 的分离方法是极其有效的。

我们可以设计分别定位于不同的分类等级上的, 如种、属、科、目、纲等 rRNA 分子上的特异性探针, 对单个细胞进行鉴别分类, 也可从复杂的环境样品中探测出某种微生物的存在。FISH 方法的建立有着其重要的意义, 它不仅可以作为我们筛选 *Actinobacteria* 的一种鉴别方法, 而且也将用于我们以后对自然环境中微生物生态的调查。将 FISH 的方法和它的方法联合使用, 也将对新抗生素的筛选有着一定的靶向作用。

## 参 考 文 献

- [1] Stackebrandt E, Rainey, F A, Ward-Rainey N L. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47 (2): 479.
- [2] Aamann R I, Krumholz L, Stahl D A. *J Bacteriol*, 1990; 172: 762.
- [3] Amann R, Stromley J, Devereux R, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1992; 58: 614.
- [4] Beimfohr C, Karuse A, Amann R, *et al.* *System Appl Microbiol.* 1993; 16: 450.
- [5] Roller, C, Wagner, M, Amann R, *et al.* *Microbiology*, 1994; 140: 2849.
- [6] 余利岩, 徐平, 姚天爵. *中国抗生素杂志*, 2000, 25 (6): 401.