

几种选择性分离稀有放线菌的方法*

肖炜 李铭刚 崔晓龙 李一青 文孟良**

(云南大学云南省微生物研究所教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)

摘要: 由于从常见放线菌中发现新化合物的几率越来越小, 人们开始将目光集中于稀有放线菌。作者介绍了近年来出现的胞外多糖胶与动孢溶液相结合的分选方法、再水化-离心法、极高频辐射法、噬菌体定向分离法和蔗糖梯度离心法等用于稀有放线菌选择性分离的方法, 以及这些稀有放线菌在产生生物活性物质方面的潜力。

关键词: 稀有放线菌, 选择性分离, 分离方法, 活性物质

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0133-05

Some Approaches for the Selective Isolation of Rare Actinomycetes*

XIAO Wei LI Ming-Gang CUI Xiao-Long LI Yi-Qing WEN Meng-Liang**

(The Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract: The focus of microbiologists has moved to the rare actinomycetes. For selective isolation of rare actinomycetes that all play the important role in bioactive compounds, the approaches which involve the methods using gellan gum and flooding solution, rehydration-centrifugation (RC), extremely high frequency radiation (EHF), bacteriophage and sucrose-gradient centrifugation were introduced in this paper.

Key words: Rare actinomycetes, Selective isolation, Isolation methods, Bioactive compounds

放线菌作为生物活性物质的主要产生菌早已成为人们研究的焦点。然而随着放线菌分离和分类研究的不断深入, 大量常见菌株已被反复研究, 因此从中发现新化合物的几率逐渐降低。由于新物种具有产生新的生物活性物质的潜力, 人们开始使用新的方法在尽可能广泛的范围内寻找新的物种, 特别是那些用常规方法很少分离到的稀有放线菌 (rare actinomycetes)^[1]。20 世纪 50 年代以来人们从稀有放线菌中发现了大量有价值的抗生素, 如小单孢菌产生的庆大霉素, 诺卡氏菌产生的利福霉素, 马杜拉放线菌产生的马杜拉霉素和洋红霉素, 糖多孢菌产生的红霉素, 游动放线菌产生的游壁菌素, 拟无枝酸菌产生的万古霉素等等。这些事实表明稀有放线菌也具有产生新抗生素的巨大潜力^[1,2]。分离这些稀有放线菌, 不仅可以减少对产生已知生物活性物质菌株的重复分离, 还可扩展放线菌次生代谢产物的化学多样性。

由于稀有放线菌对生长环境的特殊要求, 难以用常规手段分离获得, 所以要根据不同类群的特性设计针对这些特定种属的选择性分离方法。近年来, 国内外学者在对

*国家自然科学基金资助项目 (No. 20362009、20462008、30460022、30460004)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 20362009、20462008、30460022、30460004)

云南省自然科学基金重点项目 (No. 2004C0002Z)

**通讯作者 Tel: 0871-5032170, E-mail: mlwen@ynu.edu.cn

作者还有: 刘宏伟 陈义光 彭谦

收稿日期: 2005-04-07, 修回日期: 2005-06-01

稀有放线菌选择性分离的研究方面取得了较大进展^[3-6]，同时也用这些选择性分离方法分离到不少稀有放线菌，并显著提高了具有医用前景的生物活性物质的发现机率。此外，这些分离方法的使用也有助于回答这样一个问题：稀有放线菌很少被分离到是因为它们在环境中数量稀少，还是仅仅因为它们难以被分离和培养。本文就以上情况介绍了近年来发展起来的几种高选择性分离稀有放线菌的有效方法。

1 胞外多糖胶 (gellan gum) 和动孢溶液 (flooding solution) 相结合的分 离方法

Gellan gum 是由 *Pseudomonas elodea* 产生的胞外多糖，过去常用来作为植物组织培养的凝固剂，能促进植物生长。Suzuki 等人^[3] 首先将其用于稀有放线菌的分离，并发现胞外多糖胶能促进很多放线菌的气生菌丝生长和孢子形成。

很多物质都能增加放线菌游动孢子的游动性，如蛋白胨，牛肉膏，含土壤浸汁的磷酸盐缓冲液，脱脂牛奶等。各种动孢溶液对不同的菌影响不同，Suzuki 等在使用脱脂牛奶作为动孢溶液时发现不同的菌对脱脂牛奶的浓度、pH、处理时的温度、离心时的速度及时间有不同的要求。另外，使用高压灭菌后的脱脂牛奶比使用未灭菌的脱脂牛奶所获得的游动孢子数少，这可能因刺激孢子游动性的物质对高温高压敏感所致^[4]。

1.1 选择性分离鱼孢菌 Suzuki 等曾以鱼孢菌作为他们筛选生物活性物质的目标菌，对采自 28 个国家的 466 份土样进行了分离，从 21 份土样中分离到了鱼孢菌，发现鱼孢菌广泛分布于亚洲，欧洲，大洋洲，南美洲和北美洲。

他们所使用的高选择性分离方法是^[4]：200mg 土样自然风干→80℃干热处理 60min→冷却，加 2mL 0.1% 脱脂牛奶（溶于 10mmol/L MOPS, pH 8.0）→27℃温育 60min，不时摇动以释放游动孢子→1,000 × g 室温离心 10min→取上清液梯度稀释后涂布 HVG 平板（0.05% 腐殖酸，2mmol/L CaCl₂，0.7% 胞外多糖胶），27℃培养 21~28d。

HVG 培养基是在 HVA 培养基的基础上改进的，与 HVA 不同的是 HVG 含有 CaCl₂，并以胞外多糖胶代替琼脂。加入适量的 CaCl₂ 不仅使胞外多糖胶得以凝固，而且比加入 MgSO₄ 和 MgCl₂ 更有利于某些放线菌的气生菌丝生长和孢子形成^[5]。

1.2 选择性分离游动单孢菌 玫瑰色游动单孢菌能产生孢囊霉素，这种含硫的抗生素能通过抑制芽孢杆菌等革兰氏阳性菌的蛋白合成而影响其生长。

对游动单孢菌的高选择性分离程序是^[6]：500mg 土样自然风干→100℃干热处理 60min→冷却，加入 2mL 灭菌的 0.1% 脱脂牛奶（溶于 5mmol/L CHES, pH 9.0）→32℃温育 90min，不时摇动以释放游动孢子→1,000 × g，室温离心 10min→再于 32℃温育 60min→取上清液梯度稀释后涂布于 HSG 平板（含三甲氧苄二氨嘧啶 20mg/L，萘啶酸 10mg/L，依诺沙星 20mg/L，氨苄青霉素钠 2mg/L，放线酮 50mg/L，制霉菌素 50 mg/L），35℃培养 14~21d。用这种方法对 1,200 份土样进行分离时，从 137 份土样中分离到 246 株游动单孢菌。并发现委内瑞拉游动单孢菌广泛存在于从热带到温带的土壤中，但在土壤中的密度很低。

HSG 培养基组成：0.05% 腐质酸，3mmol/L CaCl₂，0.0001% FeSO₄ · 7H₂O，0.0001% MnCl₂ · 4H₂O，0.0001% ZnSO₄ · 7H₂O，0.0001% NiSO₄ · 6H₂O，5mmol/L CHES，0.7% 胞外多糖胶，pH9.0。

1.3 选择性分离游动双孢菌 对游动双孢菌 (*Planobispora*) 的高选择性分离程序

是^[7]: 500mg 土样自然风干→90℃干热处理 60min→冷却, 加入 2mL 0.1% 脱脂牛奶, 0.01% Tween80, 100mg/L 三甲氧苄二氨嘧啶, 100mg/L 萘啶酸 (溶于 5mmol/L CHES, pH 9.0) →35℃温育 60min, 不时摇动以释放游动孢子→1,000 × g, 室温离心 10min→取上清液梯度稀释后涂布 HSG 平板 (含三甲氧苄二氨嘧啶 50mg/L, 萘啶酸 50mg/L, 依诺沙星 20mg/L, 氨苄青霉素钠 2mg/L, 链霉素 1mg/L, 放线酮 50mg/L, 制霉菌素 50 mg/L, pH9.0), 32℃培养 14~21d。利用这种方法, 对采自世界各地的 1,467 份土样进行的分离中, 从 51 份土样中分离到 119 株游动双孢菌, 88% 的游动双孢菌分离于 pH7.0~7.9 的土样, 并发现游动双孢菌只出现在热带和亚热带的土样中。

2 再水化—离心法 (rehydration-centrifugation)

具游动孢子的放线菌能在干燥时形成孢子或孢子囊, 而当再次湿润时释放出活跃的孢子。游动孢子会受到某些物质的吸引, 停留下来再次繁殖。对游动孢子的分离方法很多, 如使用头发或花粉为诱饵的捕集法; 以毛细管来进行的化学趋化法等。这些方法虽然也能分离到某些稀有放线菌, 但要么费时费力, 要么对设备和操作人员有特殊要求。最近, Hayakawa 等人在 Makkar 和 Cross 的再水化法^[8]基础上发明了再水化-离心法^[9], 分离稀有放线菌, 效果显著。

操作具体程序是: 取 500mg 风干磨细土壤于锥形瓶中→用 50mL 含 10% 土壤提取液的 10mmol/L 磷酸盐缓冲液轻轻润洗→铝箔覆盖, 30℃温育 90min→取 8mL 润洗液, 1,500 × g, 室温离心 20min→静置 30min→0.2mL 涂布 HV 琼脂 (含三甲氧苄二氨嘧啶 20mg/L, 萘啶酸 10mg/L, 放线酮 50mg/L)。分离平板的总菌落数随土样而不同, 有 37%~86% 是具游动孢子的稀有放线菌, 其中以游动放线菌和指孢囊菌为主。在不同样品中也能分离到放线动孢菌, 短链游动菌和动孢囊菌。

上述方法经 Otaguro 等人^[10]改进后可高选择性分离束丝放线菌 (*Actinosynnema*)。

风干搅碎的样品置研钵中按 10:1 (w/w) 的量加入 CaCO₃ 粉末, 混匀→铺于玻璃纤维膜上, 加无菌水使样品湿度达 20% (w/w) →26℃培养 14d→样品室温风干至恒重, 置于平皿, 加 50mL 含 10% 土壤提取液的 10mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) →30℃浸泡 2h→取 8mL 上述溶液 1,500 × g, 室温离心 20min→静置 30min→取上清涂布 HV 琼脂 (含弗氏霉素 40mg/L, 卡那霉素 40mg/L, 三甲氧苄二氨嘧啶 20mg/L, 萘啶酸 10mg/L), 30℃培养 2~3 周。Otaguro 等人用上述方法对 39 份样品进行分离, 其中 17 份样品分离到束丝放线菌, 其检出率占总菌落数的 4%~86%。对任意选取的 29 株束丝放线菌进行的抗菌试验发现其中 28 株具有抗菌活性。

HVA 培养基 (1L) 组成: 腐殖酸 0.1g, CaCO₃ 0.02g, Na₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, KCl 1.7g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01g, 核黄素 0.5mg, 硫胺素 0.5mg, 维生素 B₆ 0.5mg, 烟酸 0.5mg, 肌醇 0.5mg, 泛酸 0.5mg, 生物素 0.25mg, 对-氨基苯甲酸 0.5mg, 琼脂 18g, pH7.2。

3 极高频辐射法 (extremely high frequency radiation)

应用极高频辐射法 (EHF) 分离稀有放线菌的机理在于 EHF 能抑制一些原核生物, 藻类和单细胞微生物的生长, 促进某些异养和光合微生物的生长及休眠菌株的复苏。所以采用极高频辐射 EHF 法可以选择性地分离那些能耐受 EHF 甚至受到 EHF 激

活的菌株。

具体过程是^[11]：取 100mg 磨碎混匀的土样悬浮于 10mL 无菌水中，用频率为 1kHz 的 EHF 照射盛有土壤悬液的试管或平皿底部（所使用的 EHF 无热效应）。处理方式有两种：一种是以 5.6mm 或 7.1mm 单一波长处理；另一种是以 3.8mm ~ 5.8mm 或 8mm ~ 11.5mm 波长连续处理。处理后两种土样都涂布于 Gauze 2 琼脂（含萘啶酸 10 mg/L，制霉菌素 50 mg/L）。

结果显示，以单一波长 5.6mm 或 7.1mm 处理不能选择性分离到稀有放线菌。而以 3.8mm ~ 5.8mm 和 8mm ~ 11.5mm 波长连续处理后，稀有放线菌的比例从原来的 4.1% 分别升至 8.4% 和 30.6%。其中马杜拉菌，小四孢菌和野野村菌的绝对数量大为提高，同时还能分离到那些普通方法无法分离到的菌株，如拟无枝酸菌和拟诺卡氏菌。并且，分离物中具抗菌活性的菌株分别增加了 13% 和 20%。

在此基础上 Li 等人^[12]将极高频辐射法与连续分析相结合，能分离到单独使用这两种方法所不能分离到的稀有放线菌，如珊瑚状放线菌、原小单孢菌、游动放线菌和拟孢囊菌，同时，具有抗菌活性的菌株数量增加了 10% ~ 20%。

具体程序是：加无菌水使土样湿度达 30% (w/w) → 撒在普通琼脂培养基上 → 第 0, 7, 14, 30, 45d 分别取样进行 4.6mm ~ 5.8mm 和 8mm ~ 11.5mm 两种波段的 EHF 处理（在取样前土样始终保持 30% 的湿度）→ 涂布于土壤浸汁琼脂即可（含 1mL/L 维生素溶液：10mg 泛酸钙，10mg 尼克酸，1mg 硫胺素以及微量的生物素共同溶于 20mL 水；10mg/L 萘啶酸；50mg/L 制霉菌素）。

4 噬菌体定向分离法 (bacteriophage)

传统的分离方法由于对土样的微生物多样性等基本情况了解较少，加之放线菌生长缓慢，于是可能浪费数月的时间去分离土样中并不存在的菌株，而当目标菌又是稀有放线菌时更是如此。基于这一原因，Esther 等人^[13]设计了一种以细菌噬菌体作为指示物对环境样品中的野野村菌 (*Nonomuria*) 进行快速筛选和分离的新方法。首先确定土样中是否含有能感染目标菌的噬菌体。具体步骤如下：

3g 土样悬浮于 100mL PYCa 液体中 → 28℃, 250r/min, 培养 24h → 培养液 3,000g 离心 20min → 上清液经 0.45μm 滤膜过滤 → 取 5μL 滤液接种于野野村菌菌苔上 → 28℃ 培养 48h 以上 → 将含有噬菌斑的琼脂切下，用 5mL PYCa 洗涤 → 洗液经 0.45μm 滤膜过滤 → 点接滤液于长有野野村菌菌苔的琼脂上以确定噬菌体是否可以再生。

对能产生噬菌斑的土样，采用常规的选择性分离方法对目标菌进行分离。结果，放线菌中 20% 为野野村菌。可见其并不是我们以前所认为的那样“稀有”。同时，我们也可以将适量的只对一种或几种链霉菌有裂解作用的噬菌体加入土样中来减少非目标菌的数量。

5 蔗糖梯度离心法 (sucrose-gradient centrifugation)

由于土壤中营养贫乏，放线菌大部分以孢子形式存在，因此可以利用孢子的不同特性对不同的放线菌进行选择分离。Karwowski^[14]等人曾根据放线菌孢子浮力密度的差异，利用氯化铯密度梯度超速离心有效地从土壤中分离小单孢菌。最近，Yamamura 等人^[15]根据这一特性，运用蔗糖梯度离心选择性地分离诺卡氏菌，也取得了成功。

其方法是:在离心管中从上到下设置各1mL的10%、20%、30%、40%、50%(w/v)的蔗糖梯度。将用无菌水稀释为 10^{-1} 土壤悬液1mL加入到离心管上层,240×g,室温离心30min。离心后把每层蔗糖取出稀释后涂布0.2mL于HV琼脂(含萘啶酸10mg/L,放线酮50mg/L,金霉素10mg/L)。

结果,大部分诺卡氏菌(*Nocardia*)的孢子出现在20%的蔗糖层中,小单孢菌可以在20%和30%蔗糖层发现,但数量较少。游动放线菌等放线菌的游动丝状孢子只能在10%蔗糖层出现。用这种方法对14份土样进行分离时,诺卡氏菌类群的检出率占总菌落数的5%~89%,而且71%的菌有抗菌活性。

6 结语

不断涌现出的新型稀有放线菌分离方法将成为天然产物筛选中的有用工具,也使我们了解到稀有放线菌事实上广泛存在于土壤等环境中,只是由于分离方法和手段的不完善才使得它们较少获得。当然,除了使用特殊方法对稀有放线菌进行分离外,扩大分离范围也是获取稀有放线菌的一个重要手段。比如作者所在单位从80年代初开始温泉高温菌的研究,发现大量新的高温微生物资源。1991年,该所姜成林和徐丽华建立了双孢放线菌新属(*Actinobispora*)。近几年,该所还从新疆、青海样品中发现嗜盐放线菌新属一个、嗜冷链霉菌新种一个、嗜盐放线菌新种6个、嗜碱放线菌新种4个。这些材料为我们的天然产物筛选奠定了坚实的基础。

在寻找下一代化学治疗剂和新的生物活性物质的过程中,放线菌特别是稀有放线菌仍然是重要的目标菌。目前,已有超过120种抗生素由游动放线菌产生,250多种抗生素是由马杜拉放线菌产生,到1998年共发现有32种生物活性物质来源于链孢囊菌,这些化合物都具有广泛的化学多样性,使得这些菌成为工业开发的重点对象。因此,分离和培养那些出现频率较低的微生物将是微生物工作者今后的一项重要任务。

参考文献

- [1] 刘志恒,姜成林主编.放线菌现代生物学与生物技术.北京:科学出版社,2004.244~245.
- [2] Ameriga L, Linda C, Giorgio T, et al. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, **78**: 399~405.
- [3] Suzuki S. *Actinomycetol*, 2001, **15**: 55~60.
- [4] Suzuki S, Okuda T, Komatsubara T. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65** (5): 1930~1935.
- [5] Suzuki S, Takahashi K, Okuda T, et al. *Can J Microbiol*, 1998, **44**: 1~5.
- [6] Suzuki S, Okuda T, Komatsubara S. *Can J Microbiol*, 2001, **47**: 253~263.
- [7] Suzuki S, Okuda T, Komatsubara S. *Can J Microbiol*, 2001, **47**: 979~986.
- [8] Makkar N S, Cross T. *J Appl Bacteriol*, 1982, **52**: 209~218.
- [9] Hayakawa M, Otaguro M, Takeuchi T, et al. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2000, **78** (2): 171~185.
- [10] Otaguro M, Hayakawa M, Yamazaki T, et al. *J Appl Microbiol*, 2001, **91**: 118~130.
- [11] Li Yu V, Terekhova L P, Gapochka M G. *Microbiology*, 2002, **71** (1): 105~107.
- [12] Li Yu V, Terekhova L P, Alferova I V, et al. *Microbiology*, 2003, **72** (1): 114~117.
- [13] Esther W N, Alastair C W, Natasa P C, et al. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**: 897~900.
- [14] Karwowski J P. *Journal of Industrial Microbiology*, 1986, **1**: 181~186.
- [15] Yamamura H, Hayakawa M, Jimura Y. *J Appl Microbiol*, 2003, **95** (4): 677~685.