

放线菌研究专栏

编者按语:放线菌是一类重要的微生物资源。近年来,用分子生物学方法证明自然界实际存在的绝大部分放线菌仍然难以纯培养。如何获得这些未知放线菌是资源利用的重要前提。这就涉及到放线菌分离及分类。本专栏将本着先进、实用的原则,有选择地介绍这方面的最新进展和研究供参考。

稀有放线菌分离方法*

姜 怡^{1,2} 段淑蓉¹ 唐蜀昆¹ 陈华红¹ 李文均¹ 徐丽华^{1*}

(微生物药物国家工程研究中心 云南省微生物研究所 昆明 650091)¹

(Leibniz-Institut für Meereswissenschaften an der Universität Kiel, Düsternbrooker Weg 20, D-24105 Kiel, Germany)²

摘要:稀有放线菌是生物活性物质的重要来源。从样品预处理,抑制剂的选择,噬菌体的使用,碳源的选择及培养基的设计等各个方面介绍了稀有放线菌分离方法及作者的经验。

关键词:稀有放线菌,分离方法

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 01-0181-03

稀有放线菌是指除常见的链霉菌以外的其他放线菌,而不是一个具体的分类学单元。稀有放线菌能产生众多生物活性物质,包括红霉素,利富平、马杜拉霉素、洋红霉素等抗生素,酶类、维生素等。其中一些抗生素已商业化,产生巨大的社会效益和经济价值。研究表明,环境中只有极少一部分放线菌得到纯培养。因此,分离那些未知放线菌是利用这类资源的首要前提之一。一些实验室曾经在特定类群放线菌的分离方面进行过研究,但稀有放线菌的出菌率仍然偏低^[1]。结合本实验室的经验,介绍实用的稀有放线菌选择性分离方法。

1 样品的预处理

预处理的目的在于减少细菌和真菌的污染,增加目的稀有放线菌的出菌率。我们曾经做过试验,土壤风干 20d,能使 90% 以上的细菌死亡,对消除细菌污染很有效。但要分离放线细菌 (*Actinobacteria*) 时,不宜风干土样。风干土壤样品在 100℃ 或 120℃ 干热处理 60min,可以有效分离 *Streptosporangium*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Actinoplanes* 等稀有放线菌; 60℃ ~ 65℃ 处理 120min,能有效分离 *Micromonospora*。将土壤悬液加入 6% 的酵母膏和 0.05% 的十二烷基硫酸钠的混合液,在 40℃ 处理 20min,能有效地分离到 *Micromonospora*, *Dactylosporangium*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*。用 1.0% 氯胺-T 处理土壤悬液可以使 *Microbispora*, *Microtetraspora* 和 *Streptosporangium* 出菌率达到 40% ~ 56%^[2] 土

* 国家 973 项目 (No. 2004CB719601)

国家自然科学基金项目 (No. 30270004, 30560001)

** 通讯作者 Tel: 0871-5035263, Fax: 0871-5173878, E-mail: lihxu@ynu.edu.cn

收稿日期: 2005-11-15, 修回日期: 2005-12-26

壤悬液经差速离心或极高频辐射 (extremely high frequencies EHF), 可有效地分离到 *Actinocorallia*, *Promicromonospora*, *Nono-muraea* 和 *Kibdelosporangium*, 提高出菌率 10% ~ 20%^[3]。

分别采用 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 和 50W 超声波处理, 有利于微生物脱离土壤颗粒, 可促使微生物均匀地分布于土壤悬液中。用 MOPS (morpholinepropanesulfonic acid)、丙烯酰胺、海藻糖和乙二胺四乙酸 (EDTA) 等处理样品, 稀有放线菌的出菌率可超过 50%。

2 富集培养

富集培养是利用目标菌的某些特性, 在土壤等样品中加入一些特殊物质, 诱导目标菌大量富集, 提高选择性分离效果。有报道用松花粉或 CaCO_3 等可以诱导富集游动孢子。

钙离子可以刺激放线菌菌丝的形成, 利用 CaCO_3 能富集分离 *Actinokineospora*。将土样 (5g) 风干后, 用土和 CaCO_3 10:1 (w/w) 的比例均匀混合, 补充少量无菌水保持样品湿润, 26℃ 放置 14d; 再风干后加入 50mL 磷酸缓冲液 (10mmolL^{-1} , PH 7.0) 30℃ 震荡 2h; 随后 $1,500 \times g$, 离心 20min; 进行稀释涂布平板^[4]。

脱脂牛奶能刺激 *Sporichthya* 孢子运动, 在 pH 8.0 的溶液中孢子运动频率最大, 脱脂牛奶结合离心是分离动孢菌的有效方法。将风干土样 80℃ 干热处理 1h 后, 加入含 MOPS 的 0.1% 脱脂牛奶 (未灭菌) 27℃ 震荡 1h, $1,000 \times g$ 离心 10min, 用无菌生理盐水梯度稀释, 涂布平板。研究发现高温会破坏脱脂牛奶中的刺激因子。脱脂牛奶经高温灭菌后失去刺激效果^[5]。由于 *Sporichthya* 对大多数抗生素敏感, 所以培养基中尽量少用抗生素抑制剂。

氯化钙可促进 *Actinobispora* 气生孢子的形成。

3 抑制剂的选择

为了分离稀有放线菌, 对抑制剂的要求有两方面: 一是抑制真菌和细菌, 而又不抑制目的菌; 二是抑制非目的放线菌 (如常见链霉菌), 而不抑制目的菌。放线菌酮 (100mg/L)、制霉菌素 (100mg/L) 能有效抑制真菌, 同时不影响放线菌的生长。青霉素 (1~5 mg/L), 链霉素 (10~20mg/L) 能抑制细菌, 但也容易抑制放线菌, 因此使用时要慎重。为了分离某个特定的放线菌, 可以采用选择性抑制剂。分离培养基加入 50gm/L 的放线菌酮可以选择性分离 *Dactylosporangium*, *Micromonospora*, *Microbispora*, *Microtetraspora* 和 *Streptosporangium* 等属的菌种。使用 25mg/L 的放线菌酮和 20mg/L 的新生霉素, 可以分离到 *Actinoplanes*, 用 25mg/L 的新生霉素和 15mg/L 的链霉素, 可以分离到 *Glycomyces*, 用 2~5mg/L 的庆大霉素, 可以分离到 *Streptosporangium*, *Actinomadura*, *Microtetraspora*。我们推荐两组稀有放线菌分离用的抑制剂供选用: 100mg/L 的放线菌酮 (或 100mg/L 制霉菌素) 和 20mg/L 的茶啶酮酸; 50~75mg/L 的重铬酸钾。这两组抑制剂都可以很好地抑制真菌和常见细菌, 使稀有放线菌的出菌率大大提高。加入卡那霉素、交沙霉素、溶菌酶和茶啶酸可以使 *Actinomadura viridis* 出菌率达到 65%^[6]。

S3-phage 是一类对 *Streptomyces albus* 专一性的噬菌体, S7-phage 是除了 *Streptomyces olivaceus* 外, 对其它 80 多种链霉菌都具侵染力, 而且裂解能力强。使用噬菌体能

有效裂解常见链霉菌,能大幅度提高稀有放线菌的出菌率。但是有两点值得注意。第一,自然界仍然存在大量未知链霉菌,它们也是目的菌,我们不清楚这两种噬菌体是否会裂解这些未知链霉菌;第二,也不清楚,加入噬菌体以后分离到的链霉菌是否已感染噬菌体?是否会成为溶原性噬菌体?因此,建议慎重使用噬菌体。

4 培养基的设计

碳源是培养基的基本成分,甘油、淀粉、葡萄糖、腐殖酸等已广泛应用于放线菌分离培养基。再使用这些碳源,常见放线菌的出菌率会很大。因此探索“稀有”碳源,用于稀有放线菌分离,是一项重要内容。

分离培养基加入微量的维生素混合物常常有利于稀有放线菌的生长。

Gellan gum(一类菌多糖)是一种很好的载体,用它代替琼脂,采用HV培养基^[7]作为基础培养基,用1g/L的CaCl₂代替CaCO₃,可以有效分离*Actinobispora*, *Longispora*, *Kitasatospora*, *Microbispora*, *Nocardiosis*, *Actinoplanes*等很多未知放线菌^[8~10]。

下面推荐3个分离培养基,稀有放线菌的出菌率一般都会超过50%。(1)海藻糖-脯氨酸培养基:海藻糖5g,脯氨酸1g,(NH₄)₂SO₄1g,NaCl1g,CaCl₂2g,K₂HPO₄1g,MgSO₄·7H₂O1g,复合维生素(维生素B1、核黄素、烟酸、维生素B6、泛酸钙、肌醇、p-氨基苯甲酸各0.5mg,生物素0.25mg,下同),琼脂20g,pH7.2;(2)改良脯氨酸培养基:脯氨酸5g,琼脂20g,pH7.2;(3)改良高氏二号改良培养基:葡萄糖1g,蛋白胨0.5g,胰胨0.3g,NaCl0.5g,琼脂1.5g,复合维生素,琼脂20g,pH7.2。

Waksman发现链霉素以后,开启对放线菌的广泛研究,大量放线菌被多次“发现”和描述。现在要发现新的放线菌是越来越困难了。但是从现代分子生物学的研究结果看,未知放线菌仍然无穷无尽。因此,不断设计新的简便、有效的分离程序,分离未知菌仍然是放线菌资源开发的关键之一。为此,第一,要不断改变培养基的成分(尤其是碳源的种类和量),设计新的培养基。第二,不断选用专一性的选择性抑制剂。第三,更新平板稀释法,创造完全新型的分离方法。

参考文献

- [1] 李文均,张忠泽,姜成林. 国外医药抗生素分册,2002,23:18~22.
- [2] Hayakawa, M, Iino H, Takeuchi S, et al. J Ferm Bioeng, 1997, 84: 599~602.
- [3] Li Yu V, Terekhova L P, Alferova I V, et al. Mikrobiologiya, 2003, 72: 114~117.
- [4] Otaguro M, Hayakawa M, Yamazaki T, et al. J Appl Microbiol, 2001, 91: 118~130.
- [5] Makkar, N S, Cross T. J Appl Bacteriol, 1982, 52: 209~218.
- [6] Hayakawa M, Momose Y, Kajiura T, et al. J Ferment Bioeng, 1995, 79: 287~289.
- [7] Nonomura H, Yamamura M. In Biology of Actinomycetes' 88, Tokyo: Japan Sci Soc Press, 1988, 288~293.
- [8] Suzuki S, Takahashi K, Okuda T, et al. Can J Microbiol, 1998, 44: 1~5.
- [9] Takahashi Y, Omura S J. Gen Appl Microbiol, 2003, 49: 141~154.
- [10] Takahashi Y. Actinomycetologica, 2004, 18: 54~61.