

自然界中难分离培养微生物的分离和应用*

岳秀娟 余利岩** 李秋萍 魏玉珍 关艳 张月琴

(中国协和医科大学医药生物技术研究所以微生物药物筛选重点实验室
药用微生物菌种保藏管理中心 北京 100050)

摘要: 采用在分离培养基中添加自然来源的抽提液, 或加入一些特殊化合物, 使其中处于 Viable but non-culturable (VBNC) 状态的微生物恢复其生长繁殖能力, 从而得到分离。实验结果发现甜菜碱、丙酮酸钠、SOD 以及过氧化氢酶可使分离到的微生物种类及菌落总数明显增加。还采用固液结合的方法来分离那些在普通平板培养基上不能形成肉眼可见菌落的那些微小菌落的微生物。采用这几种方法从 4 份土壤样品中共分离得到 52 株放线菌, 103 株细菌, 17 株真菌。对其中的放线菌和真菌进行了生物活性的测定, 得到多株具有抗菌活性的微生物, 经过多次复筛的平均阳性率为 4.325%, 略高于用常规方法分离得到的微生物。因此证明有效的分离方法将为今后微生物药物的筛选和药用微生物菌种的保藏提供更丰富的来源。

关键词: 难分离培养微生物, 微小菌落, 微生物药物

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2006) 03-0077-05

Study of Methods to Isolate Viable but Non-culturable Microorganisms from Natural Environments*

YUE Xiu-Juan YU Li-Yan** LI Qiu-Ping WEI Yu-Zhen
GUAN Yan ZHANG Yue-Qin

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

Abstract: This project is targeted on exploring some improving approaches to isolate and culture the microorganisms which are difficult to be isolated and cultured through the conventional ways. The results showed that betaine, sodium pyruvate, SOD and catalase are helpful for increasing the total number and variety of isolated strains. A kind of combined method was also used to isolate the micro-colony which can not be seen by naked eyes on the plates. Totally 52 *Actinomycetes* and 103 bacteria and 17 fungi were obtained from 4 soil samples using the above methods. 4.325% microorganisms were obtained as positive strains to inhibit the growth of some kinds of test bacteria, which is higher than the percent using generally isolated ones. These microbial natural products may remain an important resource for the drug discovery.

Key words: Viable but non-culturable, Microcolony, Microbial medicine

自然界中的微生物分布广、种类多、资源极其丰富。目前比较肯定的微生物种数大约有 10 万种, 然而由于过去一直采用传统的分离培养方法, 迄今人们已发现的微生物物种仅为自然界中微生物总数的 1% ~ 10% 左右, 用传统方法从自然环境中分离得到的微生物远远不能代表自然环境中微生物的全部种类, 不断发展新的方法来分离和认

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30100001)

** 通讯作者 Tel: 010-63187118, E-mail: yuliyang_2000@yahoo.com

收稿日期: 2005-08-25, 修回日期: 2005-10-24

识环境中尚未被分离培养的新的微生物种类对于获得新的微生物药物具有十分重要的意义^[1]。

本文的研究目的是改进传统的分离方法,寻找那些被传统分离方法忽略掉的,尚未被分离培养出来的微生物新物种的分离培养方法。

我们首先探索了在培养基中加入土壤浸出液的分离方法,发现 4 株必须在含有土壤浸出液的培养基上才能生长的微生物。我们又探索了在普通分离培养基中加入一些特殊物质,使土壤中难分离培养微生物得以恢复生长繁殖能力的方法,实验证明甜菜碱、丙酮酸钠、SOD 以及过氧化氢酶可使分离到的微生物种类及菌落总数明显增加。我们还探索了固液结合的方法来分离那些在普通平板培养基上不能形成肉眼可见菌落的那些微生物。目前通过这几种方法我们已经分离得到 52 株放线菌,103 株细菌,17 株真菌,对其中的放线菌和真菌进行发酵初筛和活性测定,得到抗绿脓杆菌外排泵模型的阳性菌株 9 株,结核杆菌 DNA 回旋酶模型阳性菌株 21 株,抗 Niger 阳性菌株 8 株,抗掷孢酵母 SO₄ 阳性菌株 10 株。将上述模型的初筛阳性菌株进行复筛,分别得到以上各模型的阳性菌株 3 株,4 株,2 株,3 株,阳性率分别为 4.3%,5.8%,2.9%,和 4.3%。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土壤样品:北京远郊土样,内蒙古额尔古纳草原土样,长城遗址土样,美国肯尼亚土样。

1.1.2 培养基:TSA 培养基:3% 的 TSB (Trypsinase Soy Broth, Difco 公司),1.5% 琼脂, pH7.0~7.2。

1.2 实验方法

1.2.1 含有土壤提取液培养基的分离实验:将稀释到 10^{-6} 倍的土样涂布到含有土壤提取液的 TSA 培养基上,待菌落形成以后,采用影印法将上述固体培养基上的菌落接种不含土壤提取液的 TSA 培养基上,记录只在含有土壤提取液的各种培养基上生长的菌株数量。

1.2.2 各种添加物的加入:文献报道甜菜碱、SOD^[2]、过氧化氢酶、 β -环化糊精和脯氨酸^[3]能够增加分离到的微生物种类,而丙酮酸钠能够使处于 VBNC 状态的微生物得以恢复生长繁殖能力,因此我们把这几种物质添加到平板培养基上,考察其是否能够提高分离效率。

1.2.3 各种添加物最佳浓度范围的探索:为探索各种添加物的最佳浓度,同时减少试验次数,提高效率,首先采用均匀设计的方法缩小各种添加物的最佳浓度的考察范围(表 1)。然后在缩小后的浓度范围内逐一考察不同浓度的添加物对于分离难分离培养微生物的作用效果,从而确定最佳浓度。

表 1 各种添加物最佳浓度范围探索试验方案

添加物	丙酮酸钠 (g/v)	甜菜碱 (g/v)	SOD (μ /mL)	过氧化氢酶 (μ /mL)
浓度组 1	1.000%	0.500%	0.250	1.25
浓度组 2	0.500%	0.125%	1.000	2.50
浓度组 3	0.250%	1.000%	0.125	5.00
浓度组 4	0.125%	0.250%	0.500	10.00

1.2.4 微小菌落^[4]分离实验: 将样品涂布到覆有灭好菌的孔径为 0.30μm 的硝酸纤维素薄膜的固体平板上培养 3~4d, 小心的揭掉薄膜, 继续培养 12d, 用钢铲挖取平板上未长菌落的地方, 放到 1/10 TSB 液体培养基及含有最佳浓度甜菜碱、丙酮酸钠、SOD、过氧化氢酶的 1/10 TSB 液体培养基中, 28℃ 振荡培养, 从第 3d 起每天观察生长情况, 一旦有肉眼可见的菌丝生长即用灭菌的竹签沾取液体培养基在平板上划线。

1.2.5 对分离到的菌株进行发酵测其生物活性: 将检定菌和相应的抗生素以及培养基按照一定的比例混匀, 制成检定平板, 用直径为 10mm 的圆形纸浆片浸取发酵液, 放于检定平板上, 37℃ 过夜后测定抑菌圈的直径和透明度。

2 结果与讨论

2.1 使用土壤提取液培养基的分离结果

在我们的研究中, 从 4 份 10⁶ 土样的分离平板上总共分离到 487 个菌落, 通过点种影印法得到 4 株必须在含有土壤提取液的培养基上才能生长的菌株, 阳性率为 0.82%, 如表 2 所示。

该实验进一步证明了自然界中确实存在一些必须依赖土壤中某种天然物质才能生长的微生物, 用传统的分离方法就有可能忽略了这部分微生物的分离。

表 2 土壤浸出液需求菌株

土样	培养基类型	菌落数	土壤提取液需求株
No. 1	TSA	67	0
	TSA + 土壤提取液	75	1
No. 2	TSA	54	0
	TSA + 土壤提取液	62	2
No. 3	TSA	63	0
	TSA + 土壤提取液	70	1
No. 4	TSA	46	0
	TSA + 土壤提取液	50	0

2.2 添加各种添加物的实验结果

通过比较添加各种添加物的平板上所分离到的菌落平均数, 我们发现丙酮酸钠、甜菜碱、SOD、过氧化氢酶能够明显增加平板上可分离到的微生物的菌落总数, 而脯氨酸和 β-环化糊精没有明显作用。分析原因可能如下: 丙酮酸钠进入三羧酸循环所产生的 NADH 和 H⁺ 进入呼吸链, 最终可与超氧化物结合, 减少了超氧化物对细胞的损害。SOD 可以直接和超氧化物结合, 而过氧化氢酶通过对过氧化物的水解, 减少了过氧化物对微生物的有害作用。甜菜碱 (三甲氨基乙内酯) 的分子式为 (CH₃)₃NCH₂COO⁻, 三个甲基中, 有两个甲基可以被超氧化物或自由基氧化, 从而减少超氧化物或自由基对细胞的毒害。

表 3 培养 7d 的各种平板上的菌落的平均数

	1	2	3	4	5	6	7
菌落平均数	48	60	65	62	68	45	50

注 1 TSA, 2 TSA + 丙酮酸钠, 3 TSA + 甜菜碱, 4 TSA + SOD, 5 TSA + 过氧化氢酶, 6 TSA + 脯氨酸, 7 TSA + β-环化糊精

2.3 添加物的最佳浓度测试结果

从表 4 可看出, 通过与空白对照相对比, 试验方案 2 和 4 较 1 和 3 所分离到的菌落总数和种类均有所增加。我们另外还采用了 SPSS 软件, 对数据进行回归分析 (图 1), 结果发现较低浓度的丙酮酸钠和甜菜碱对微生物的分离效率较好, 而较高浓度的 SOD 和过氧化氢酶对微生物的分离效率较好。于是我们对甜菜碱和丙酮酸钠分别比较 0.125% 和 0.250% 两个浓度, 对 SOD 比较 0.5U/mL 和 1.0U/mL 两个浓度, 对过氧化氢酶比较 5.0 和 10.0U/mL 两个浓度, 最后确定最佳浓度分别为甜菜碱 0.125%, 丙酮酸钠为 0.125%, SOD 为 5U/mL, 过氧化氢酶为 10U/mL。结果证实计算机分析与我们直接观察的结论基本一致。

表 4 各种试验方案所分离得到的菌落数

菌落数	试验方案				
	1	2	3	4	空白
菌落总数	55	70	50	68	42
放线菌平均数	19	23	19	20	14
细菌平均数	17	10	12	11	8
真菌平均数	7	11	11	7	4

注: 试验方案见表 1

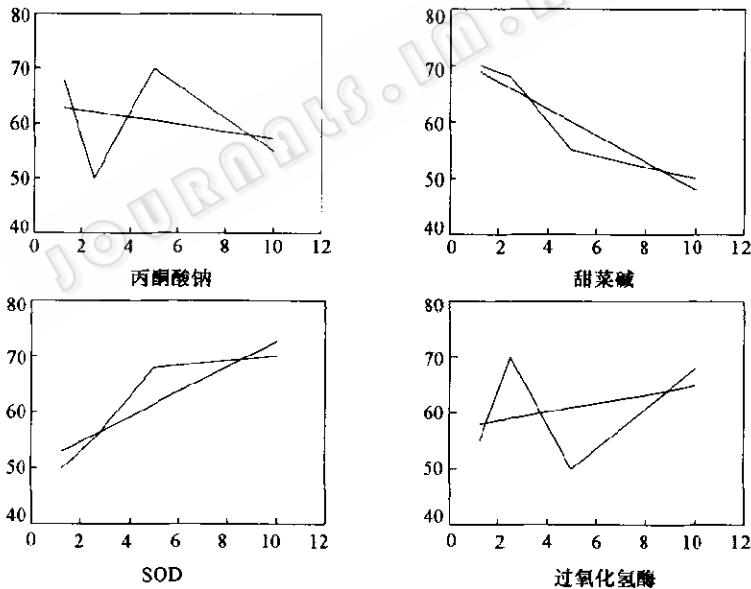


图 1 使用 SPSS 软件对 4 种添加物最适浓度的分析

直线: 线性 (虚拟), 折线: 检测

2.4 微小菌落分离实验结果

用钢铲挖取平板上未长菌落的地方, 放到 1/10 TSB 液体培养基及含有最佳浓度甜菜碱、丙酮酸钠、SOD、过氧化氢酶的 1/10 TSB 液体培养基中, 28℃ 振荡培养, 从第 3 天起每天观察生长情况, 一旦有肉眼可见的菌丝生长即用灭菌的竹签沾取液体培养基在平板上划线。从开始培养到第 20 天, 我们陆续发现除 TSB 液体培养基中仍无肉眼可

见的菌丝生长外,其他含各种添加物的培养基中均有菌丝可见,用灭菌的竹签沾取液体,在 TSA 平板及分别含有丙酮酸钠、甜菜碱、SOD、过氧化氢酶的 TSA 平板上划线,从第 5 天开始在空白平板及含有各种添加物的平板上均有肉眼可见的菌落形成,我们将形态上具有放线菌特征的菌落重新在 TSA 平板上进行划线法分离纯化,发现这些菌落的一个共同特点是个体非常小。

我们推测微小菌落形成的原因可能有如下两方面:其一是由于自然环境中的温度改变、紫外照射及营养缺乏等原因使其中的一部分微生物处于我们所说的 VBNC^[5]状态,处于这种状态的微生物不能在普通平板培养基上生长繁殖和形成肉眼可见的菌落,只有当条件合适时,才能恢复生长繁殖。其二是一份土样中,菌群之间有共生、互生、寄生、拮抗等多种复杂的关系,当把它们从处于生态平衡状态的自然环境中突然转入人为的环境条件中培养时,原来的平衡状态可能会被破坏,一些对新环境适应能力较强或者生长较快、延迟期较短的微生物很快形成了肉眼可见的菌落,而那些适应能力相对较差或者生长较慢、延迟期较长的微生物还没有形成肉眼可见的菌落,当这些微生物跃过了延迟期进入对数期时,所处的环境中可能已经累积了大量的有害物质,如优势菌种代谢所产生的过氧化物、自由基或一些拮抗物质,这些物质的存在,使得这部分微生物不能进入对数生长期,因而难以形成肉眼可见的菌落。

微小菌落分离法的优点在于:采用这种方法可以有效的排除采用传统分离方法经常会得到常见微生物种类,有利于把处于 VBNC 状态的微生物或在菌群之间处于劣势的微生物以及只能形成微小菌落或生长缓慢、延迟期较长的那些微生物分离出来,有针对性的对其进行恢复或使其不再处于被拮抗、或受毒害等各种不利环境中。

2.5 分离株发酵和生物活性测定结果

对分离到的放线菌和真菌进行发酵、初筛和复筛,得到绿脓杆菌外排泵模型^[6]的阳性菌株 9 株,结核杆菌 DNA 回旋酶模型阳性菌株 21 株,抗黑曲霉 *Niger* 阳性菌株 8 株,抗掷孢酵母 *SO₄* 阳性菌株 10 株。将上述模型的初筛阳性菌株重复发酵并测活,分别得到以上各模型的阳性菌株 3 株,4 株,2 株,3 株。阳性率分别为 4.3%, 5.8%, 2.9%, 和 4.3%。经过多次复筛的平均阳性率为 4.325%,高于我们用常规方法分离得到的微生物。因此证明有效的分离方法将为今后微生物药物的筛选和药用微生物菌种的保藏提供更丰富的来源。

参考文献

- [1] 岳秀娟,余利岩,张月琴. 微生物学通报, 2004, 31 (2): 108 ~ 111.
- [2] Takahashi Y, Katoh S, Shikura N, *et al.* J Gen Appl Microbiol, 2003, 49 (4): 263 ~ 266.
- [3] Bovril R A, Mackey B M. Microbiology UK, 1997, 143: 1575 ~ 1581.
- [4] Kaprelyants A S, Mukamolova G V. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 1311 ~ 1316.
- [5] Kjelleberg S, Albertson N. Antonie van Leeuwenhoek, 1993, 63: 333 ~ 341.
- [6] 田 睿,余利岩,肖春玲,等. 中国医学科学院学报, 2004; 26 (4): 359 ~ 363.