

放线菌研究专栏

海洋放线菌分离方法*

姜 怡^{1,2} 唐蜀昆¹ 王永霞¹ 李文均¹ 徐丽华^{1**}(微生物药物国家工程研究中心 云南大学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: 海洋放线菌是重要的微生物资源。介绍了样品采集及预处理, 海水使用, 培养基组成, 抑制剂使用及微囊化方法分离海洋放线菌的方法。

关键词: 海洋放线菌, 分离方法

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-00-0

海洋占地球表面的 70%, 那里是一个广阔的立体生物世界。而人们对海洋微生物的研究和利用远远不及陆地。从陆地微生物发现新的高活性物质越来越困难的今天, 人们把目光投向海洋是很自然的。Mincer 等^[1] 从 Bahamas, Red Sea, Egypt, Sea of Cortez, Mexico 等海域采集海底泥样品, 分离到上万株 Micromonosporae, 将其中 MAR 1 群菌株定为盐生孢菌属 (*Salinispora*), 认为这些物种广泛分布于不同的海域。2005 年, Antonie van Leeuwenhoek 杂志用一整期刊登 Bull 和 Goodfellow^[2] 主编的海洋放线菌 (*Actinobacteria*) 研究的成果。从 0m ~ 200m 深度的采集的样品, 有大约 9% 的放线菌可以获得纯培养; 200m ~ 2,000m, 有 0.1% ~ 17.0%; 2,000m ~ 6,000m, 有 0.8% ~ 14%; 6,000m 以下, 仅有 0.5% ~ 0.8% 可以获得纯培养。在许多海域, 海底泥表面的微生物中, 放线菌还会占优势, 其中小单孢菌科所占比重较大。目前已发现的放线菌还有 *Streptomyces*, *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Salinispora*, '*Marinomycetes*', *Aeromicrobium*, *Salinibacterium*, *Verrucosipora*, *Aureobacterium*, *Dermacoccus*, *Kocuria*, *Xestospongia*, *Gordonia*, *Micrococcus*, *Brachybacterium*, *Acidimicrobium*, '*Microthrix*' 等。可见, 海洋放线菌是大有开发潜力的微生物资源。

最近几年的工作证明, 从海洋放线菌发现新生物活性物质的几率甚至超过陆生放线菌。从海洋放线菌获得的部分活性物质有 griseorhodin A, salinosporamide A、B, marinone, lavanducyanin, gutingimycin, salinamide, tetrodotoxin, Pyrostain A 和 B, Pyrizinostatin, sporolides A、B, marinomycin A、B, tetracenomycin D1, Chromomycin A3, Enterocin, Actphenol, maltophilin, echinomycin, antimycin A, sporaviridin A1, bacillomycins, filipin, lipomycins, lagosin, aboyssomicins, ikarugamycin, elalomycin,

* 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: 2006-04-12, 修回日期: 2006-05-19

pridindolol, saphenoc acid, 1-N-methyl- (E, Z) -albonoursin, 1, 6-dihydroxyphenazine, Bu-4664L 等等。

我国有广阔的领海, 但是对海洋放线菌的研究和开发利用都做得很不够。为了研究海洋放线菌的多样性, 进一步进行开发利用, 首先就要进行分离。下面介绍一些实用的分离方法。

1 样品采集及处理

为了排除陆地微生物, 最好选择远离人类干扰的所谓“原始天然海域”作为研究对象。

一般用斯库巴自携式水下取样器采集底泥或水样。样品置于塑料瓶, 4℃ 保存, 4h 以内用如下两方法处理: (1) 1mL 底泥, 加 4mL 无菌海水, 55℃ 6min, 马上做分离; (2) 10mL 底泥样品铺于无菌培养皿内, 真空干燥约 24h, 磨细成粉末, 稀释后做分离。在取样的同时, 要采集足够量的海水。

也可以将底泥样品铺于无菌培养皿内, 25℃ ~ 28℃ 自然干燥 5 ~ 7d, 磨碎, 80℃ 或 120℃ 干热处理 60min。建议用无菌天然海水提取菌体及稀释, 涂布于平板。

2 盐、海水对放线菌生长和分离的影响

很多人的实验证明, 海洋放线菌都需要在天然海水或人工海水配制的培养基上才能生长良好。这是设计分离方法及培养基必须考虑的重要因素。

3 微囊化分离难培养放线菌

海水样品或底泥经上述处理的稀释液, 用 PBS 缓冲液 (pH7.2) 将土样稀释到终浓度为 10^7 细胞/mL。取 0.1mL 细胞悬液与 0.5mL 预热 (40℃) 的琼脂糖混合。然后将细胞-琼脂糖混合物也加到 15mL 细胞乳化剂中, 室温下 2,200 r/min 乳化 1min, 随后再在低温下以 2,200 r/min 乳化 1min, 最后油-菌悬液在低温下 1,100 r/min 边搅拌边冷却 6min。这个过程可获得大约 10^7 凝胶微粒。其中大约 10% 的凝胶微粒含有单个囊化的菌体细胞。单细胞囊化可通过显微镜监测。凝胶微粒注入到含有 25mL 培养基的无菌层析柱中。层析柱中有两层过滤膜。过滤器可以截流凝胶微粒而使未被囊化的细胞被洗脱, 从而防止自由细胞污染柱中的培养池。培养基按 13mL/h 速度泵入层析柱中, 凝胶微粒在柱中至少培养 5 周, 将微菌落喷洒到 96 孔培养盘中 (培养基见 4 节)。通过流式细胞仪可将含有菌落的凝胶微粒与自由细胞分开。分检的准确性可以通过显微镜方法证实。为了确定流式细胞仪可以检测到的囊化的最小量的细胞。以从液体培养基中获得的大肠杆菌的一系列梯度 1,000, 100, and 10 为例, 细胞按上述的方法分别囊化, 稀释培养液中的细胞通过流式细胞仪可直接计数。囊化的细胞在凝胶微粒中培养 3h 就形成菌落, 凝胶微粒可用流式细胞仪进行分析^[3]。用这种方法可以分离到大量未知菌 (图 1)。

4 培养基

(1) M1 培养基: 淀粉 10g, 酵母膏 4g, 蛋白胨 2g, 琼脂 18g 天然海水定容至 1,000 mL。

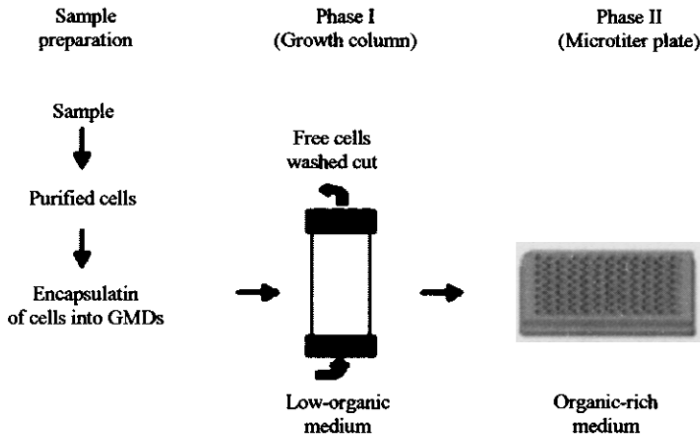


图1 微囊化分离难培养放线菌流程图

(2) M2 培养基: 甘油 6mL, 精氨酸 1g, K_2HPO_4 0.5g, K_2HPO_4 0.5 g, $MgSO_4$ 0.5g, 琼脂 18g, 天然海水定容至 1,000 mL。

(3) M3 培养基: 葡萄糖 6g, 几丁质 2g, 琼脂 18g, 天然海水定容至 1,000 mL。

(4) M4 培养基: 几丁质 2g, 琼脂 18g, 天然海水定容至 1,000 mL。

(5) M5 培养基: 琼脂 18g, 天然海水定容至 1,000 mL。

(6) 几丁质琼脂: 几丁质 2g, K_2HPO_4 0.7g, KH_2PO_4 0.3g, $MgSO_4$ 0.5g, 琼脂 20g, 天然海水定容至 1,000 mL。

(7) 海藻糖-脯氨酸培养基: 海藻糖 5g, 脯氨酸 1g, $(NH_4)_2SO_4$ 1g, NaCl 1g, $CaCl_2$ 2g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g, 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), 琼脂 20g, 天然海水定容至 1,000 mL。

HV 培养基的分离效果也较好。

5 抑制剂

分离海洋放线菌一般都需要使用抑制剂, 建议用放线菌酮 (100 或 50mg/1,000mL) 或制霉菌素 (100mg/L) 加萘啶酮酸 (20~25mg/1,000mL)。也可以用放线菌酮 (100 或 50mg/1,000mL) 或制霉菌加利富平 5~10mg/1,000mL。

参考文献

- [1] Mincer T J, Jensen P R, Kauffman C A, *et al.* Appl Env Microbiol, 2002, 68: 5005~5011.
- [2] Bull A T, Goodfellow M. Antonie van Leeuwenhoek, 2005, 87: 1~79.
- [3] Zengler K, Toledo G, Rappe M. *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 15681~15686.