

贵州黄果树土壤放线菌的 分离与纯化研究初报

周娟 龙云川 刘峙嵘 周少奇

(华东理工大学化学生物与材料科学学院, 江西南昌 330013;

贵州科学院贵州省生物研究所, 贵州贵阳 550009

华南理工大学环境与能源学院, 广东广州 510006)

【摘要】本研究从贵州黄果树采集土壤样品 19 份, 采用平板稀释法和不同培养基对放线菌进行分离、纯化培养。结果表明: 不同培养基对贵州土壤放线菌的分离效果差别较大, 从贵州黄果树采集的土样中共分离出的 32 株典型放线菌菌株, 经初步鉴定, 分别属于链霉菌属、诺卡氏菌、小单孢菌属、放线菌科和非链霉菌属。

【关键词】放线菌, 分离, 纯化

【中图分类号】Q93 **【文献标识码】**A

【文章编号】1003-6563(2016)05-0005-04

0 引言

放线菌资源作为最重要的微生物资源之一, 与其它生物资源相比, 放线菌资源分布区域更广, 海陆空无处不有, 无处不在, 具有丰富的种类和功能的多样性; 具有再生性, 能够人为地繁殖, 并提供各种产品; 具有可引种驯化性, 具有一定的稳定性和变动性等。虽然过去我们对贵州喀斯特地区微生物资源进行了一些调查, 但是这些研究只是涉及到少数菌物类群, 并且主要在几个重点地区开展, 很多地区尚存在调查盲点, 缺乏基本的微生物资源数据; 而且在以往的研究中缺乏先进的分子生物学技术如基因系统学技术的应用, 分子生物学技术可使我们更加全面、准确地了解该地区微生物的物种。

贵州黄果树瀑布是国内外著名的旅游景区, 位于贵州省西南部的安顺市, 属中亚热带典型的溶岩地区, 海拔较低, 平均海拔约 900m。放线菌往往具有比较特殊的生理功能、潜在的重要应用价值, 有关贵州黄果树土壤中所蕴含的放线菌资源还未见文献报道, 本研究以贵州黄果树景区的土壤为对象, 探索和比较放线菌分离方法, 寻求有效的适合于黄果树土壤放线菌分离的方法。

1 材料与方法

1.1 土壤样品的采集

从贵州黄果树采集土样标本，将采样地点被植被、落叶覆盖的土面表层土去除，用取样器在距离地面表面 5cm~20cm 的深处均匀的取样，剔除石砾、植被残体等，混匀，将所取样品装入密封口袋中约 200g 左右，贴好标签后带回实验室分离放线菌，若短时间不能马上分离的土样，则将土样 28℃ 烘干，放置在阴凉处下保存，切勿使土壤生潮霉变。

1.2 土壤放线菌的分离与鉴定

采用十倍稀释法制备土样，选用不同培养基进行分离。取 10g 土壤，加入到 90mL 灭菌蒸馏水中，振荡 30min，用无菌水进行 10 倍的系列稀释，从 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 和 10⁻⁵。将灭菌的培养基制成平板，待平板冷却后，将土壤菌悬液 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 用微量移液枪吸取 0.1mL 放到高氏培养基和燕麦培养基上，涂平板后进行放线菌的形态培养观察，放置在 28℃ 恒温培养箱中培养 7~10d，挑取菌落形态各不相同的菌株及时转接到高氏一号平板培养基上培养，再经过多次反复挑取单菌落进行纯化之后，转接到高氏一号试管斜面上培养 10~15d 后，进行编号保存。最后再在显微镜下进行放线菌的形态特征观察，记录单菌落的形态特征，作为鉴定菌株的依据。

参照《放线菌分类基础》、《链霉菌鉴定手册》将菌株鉴定到属或链霉菌的类群。培养特征:将菌株转接至高氏一号平板培养基上，培养 7d、15d、30d 分别记录下述特征：菌落形态、孢子堆颜色、可溶性色素颜色、气生和基内菌丝颜色。形态特征:采用插片法，培养 7d、14d、21d，分别取出盖玻片镜检，观察记录菌丝体特征。

1.3 放线菌菌株的保藏

本研究采用两种保藏方法，分别是甘油保藏和试管保藏。甘油保藏:将放线菌单菌落挑出来，接到 1mL 已灭菌的 30%甘油 EP 管里，-20℃ 冰箱保藏;试管保藏:将放线菌单菌落挑出来，在试管里划线，28℃ 培养 4-6d，4℃ 冰箱保藏。

2 结果与讨论

2.1 典型的放线菌菌落

采用十倍稀释法制备土样，用不同培养基对放线菌进行培养，分别是高氏培养基和燕麦培养基。将土壤菌悬液 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 涂平板后进行放线菌的形态培养观察，倒置于 28℃ 恒温培养箱中培养 7-10d 后观察菌落长势，挑单菌落进行分离纯化得到放线菌的纯种，最后再在显微镜下进行放线菌的形态特征观察。部分典型的放线菌平板图如图 1 所示。



图1 部分放线菌平板图

Fig. 1 Part of actinomycetes tablet

由图1可看出各菌种的孢子颜色,气丝颜色和基内丝体颜色均有所不同,有白色、橘红色、金色、黄色等,有的还有可溶性色素产生。通过以上这些观察可初步鉴定出该放线菌的菌属。

2.2 不同培养基对放线菌的影响

本研究采用平板稀释法^[8],采用两种不同培养基对放线菌进行培养,分别是高氏培养基和燕麦琼胶培养基。高氏培养基:可溶性淀粉 20 g;KNO₃ 1 g;K₂HPO₄ 0.5 g;MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g;NaCl 0.5 g;Fe-SO₄ · 7H₂O 0.01 g;琼脂 18 g;1 000 mL 蒸馏水;pH 值 7.2~7.4。121 ℃ 灭菌 30 min;然后加入重铬酸钾 75 mg / L 以抑制细菌和霉菌的生长^[9]。燕麦琼胶培养基:燕麦片 30 g,琼胶 17~20 g,水 1 000 mL,

燕麦片加水 1 000 mL,在沸水浴上加热 1 h,纱布过滤后加水补足 1 000 mL,加琼胶融化后分装灭菌 (121 ℃, 20 min)^[10]。用不同分离培养基分离土样,于 4 ℃ 冰箱保存。经 28 ℃ 恒温培养 7-10 d 后,挑选单菌落于高氏 1 号培养基中进行划线纯化。纯化菌株分别接入试管斜面和 1 mL 已灭菌的 30 % 甘油 EP 管里,于 -20 ℃ 冰箱保藏,分离结果如表 1 所示。

表 1 不同分离培养基对放线菌的影响
Tab. 1 Influence of different culture media on the actinomycetes

培养基种类	放线菌数量(×10 ⁵)	放线菌种类数	放线菌种类
高氏培养基	1.25	11	孢囊链霉菌属,粉红孢类群,黄色类群,赭灰类群,链霉菌属,球孢类群,灰褐类群,金色类群,灰红紫类群,白孢类群,小单孢菌属,类诺卡氏菌属
燕麦琼胶培养基	0.98	9	诺卡氏菌,小单孢菌属,链轮丝菌属,灰红紫类群,灰褐类群,链霉菌属,赭灰类群,淡紫灰类群,放线菌科,非链霉菌属

表 1 显示了不同培养基分离到的放线菌数量,可见不同培养基对放线菌的分离效果差别很大,放线菌数量与培养基种类有着著差异。放线菌的分离培养基多种多样,培养基中营养物质组成和比例对于放线菌的分离效果有着重要影响,用高氏培养基分离出来的放线菌的种类有 11 种,其中有孢囊链霉菌属、类诺卡氏菌属、小单孢菌属等,且放线菌的数量也较多,用燕麦培养基分离出来的种类有 9 种,且分离出来了一些不为常见的放线菌的种类,如链轮丝菌属和诺卡氏菌。结果表明不同种类培养基在分离放线菌的数量和多样性上有很大差异。因此,在分离采用不同培养基来培养可以抑制非目的菌的生长,从而提闻目的菌的出菌率。

放线菌与人类的生产和生活关系极为密切,目前广泛应用的抗生素约 70%是各种放线菌所产生。一些种类的放线菌还能产生各种酶制剂(蛋内酶、淀粉酶、和纤维素酶等)、维生素(B12)和有机酸等。从分析过程可以看出不同种类培养基在分离放线菌的数量和多样性上有较大差异。在分离时采用不同培养基来培养可以抑制非目的菌的生长,从而提高目的菌的出菌率。近年来从放线菌中发现新生物活性物质的儿率越来越低,生态环境中还有大量的放线菌资源未被人们所认识。要解决这个问题,必须开发新微生物资源,研究分离方法,其中开发新微生物物种资源是核心。

上述放线菌的分子生物学研究与 16SrDNA 序列分析有待进一步深入研究。

3 总结

本研究从贵州黄果树采集土壤样品 19 份, 采用平板稀释法和不同培养基对放线菌进行分离、纯化培养, 共分离出 32 株典型放线菌菌株, 经初步鉴定, 分别属于链霉菌属、诺卡氏菌、小单孢菌属、放线菌科和非链霉菌属。

参考文献:

[1]Berdy J. Bioactive microbial metabolites : A personal view [J]. Journal of Antibiotics, 2005, 58(1) : 1 -2.

[2]颜艳伟, 张红, 刘瑶, 等. 连作花生田根际土壤优势微生物的分离和鉴定[J]. 微生物学报, 2011, 51(6):835-842. YAN Y W, ZHANG H, LIU L, et al. Isolation and identification of dominant microorganisms in rhizosphere of continuous with cropping peanut [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 58 (6): 835-842.

[3]晏丽, 阮昌应, 解修超, 等. 秦巴山区三尖杉根际土壤放线菌的分离、筛选及活性菌株的鉴定[J]. 陕西理工大学学报(自然科学版), 2016, 32(2) :57-63.

[4]YAN L, RUAN C Y, XIE X C, et al. Isolation, screening and identification of active actinomycete from *Cephalolaxus fortunei* rhizosphere soil in Qinba Mountain[J]. Journal of Shaanxi University of Technology (Natural Science Edition) ,2016, 32(2) : 57-63.

[5]孔望君, 蒋会芳, 冉火苗, 等. 两株土壤放线菌 ZSM-1 和 ZSM-2 的分离与鉴定[J]. 食品科学, 2016, 37(11) : 114-119.

[6]KONG W J, JIANG H F, RAN H M, et al. Isolation and identification of two soil actinomycetes ZSM-1 and ZSM-2[J]. Food Science, 2016, 37(11): 114-119.

[7]Abdelfattah M S, Elmaliah M I Y, Hawas U W, et al. Isolation and characterization of marine-derived Actinomycetes with cytotoxic activity from the Red Sea coast[J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2016, 6(8) : 651-657.

[8]阮继生. 放线菌分类方法[M]. 北京: 科学出版社, 1992.

[9]中国科学院微生物研究所. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975.

[10]Kawai M, Matsutera E, Kanda H, et al. 16s ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gelelectrophoresis[J]. Appl Environ Microd, 2002, 68(2) : 699-704.

[11]康萍芝,吴秀红,张丽荣•土壤放线菌分离杂菌抑制 方法研究[J]•北方园艺,2015(24):167-170.

[12]KANG P Z,WU X H,ZHANG L R. Study on inhibition methods to miscellaneous microorganism for soil actinomycetes isolation [J]. Northern Horticulture,2015(24): 167-170.

[13]肖炜,李铭刚,崔晓龙,等•几种选择性分离稀有放 线菌的方法[J].微生物学通报,2006,33(1):133-137.

[14]XIAO W,LI M G,CUI X L,et al. Some approaches for the selec-tive isolation of rare actinomycetes[J]. Microbiology China, 2006,01:133-137.

[15]熊鹰,余金辉,阿不都克里木•热依木,等.2株嗜碱 性放线菌的分离鉴定及特性研究[J]•华中师范大学学报(自然科学版),2012,46(5):596-600.

[16]XIONG Y,YU J H,Abdukerim Rehim,et al. Isolation,identifica-tion and characterization of two basophilic actinomycosis [J] • Journal of Huazhong Normal University (Nst. Sci.), 2012, 46 (5) : 596-600.

[17]李永欣,张栋,张晓瑜,等.土壤放线菌分离与 16S rDNA 系统发育分析[J] •河南农业科学,2014, 43 (3): 75-80.

[18]LI Y X,ZHANG D,ZHANG X Y,et al. Sepration of soil action- myces and 16SrI)NA phylogenetic analysis[J]. Journal of Henan Agricultural Science,2014,43(3) :75-80.