

放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究

司美茹 薛泉宏* 来航线

(西北农林科技大学资源环境学院 杨凌 712100)

摘要: 采用平板涂抹分离法研究了培养基种类、土壤样品加热预处理及化学抑制剂对放线菌分离效果的影响。结果表明: 高氏1号琼脂培养基(GA)和秸秆腐解物琼脂培养基(SDSA)的分离结果可以反映土壤中放线菌的基本状况; $120^{\circ}\text{C} \times 1.0\text{h}$ 加热预处理土样能促进放线菌孢子萌发, 增加放线菌的分离数量和种类。供试土样经 $120^{\circ}\text{C} \times 1.0\text{h}$ 加热预处理后放线菌的数量和类型较对照处理分别增加了 5.5% ~ 54.9% 和 12.5% ~ 100%, 但加热处理对减少细菌数量作用不明显; 在放线菌分离培养基中同时加入 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $75\mu\text{g/mL}$ 与 $1 \sim 3\mu\text{g/mL}$ 青霉素, 细菌数量减少, 1号土样在 SDSA 培养基上放线菌数量 ($\times 10^6$ 个/g) 和种类(种)分别较仅加入 $75\mu\text{g/mL}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 处理减少 0 ~ 58.8% 和 0 ~ 18.2%; 链霉素不能用作分离放线菌时的细菌抑制剂。

关键词: 放线菌, 微生物资源, 放线菌分离, 培养基

中图分类号: Q93.331 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 02-0061-05

STUDIES ON SELECTION OF THE ISOLATION MEDIUM FOR ACTINOMYCETES AND INHABITION METHODS TO MISCELLANEOUS MICROORGANISM

SI Mei-Ru XUE Quan-Hong LAI Hang-Xian

(College of Resources and Environmental Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100)

Abstract: The influence of medium variety, thermal treatment of the soil samples and inhibitor to the isolation effect of actinomycetes was studied by plate paint isolation methods. The results showed that: ① The isolation results of gauze No. 1 (GA) and straw decay substance agar (SDSA) might reflect basic station of soil actinomycetes. ② Thermal treatment ($120^{\circ}\text{C} \times 1.0\text{h}$) in soils might promote actinomycetes spore sprouting and increase the quantity and variety of actinomycetes. The quantity and varieties of actinomycetes in the Soils that were treated with $120^{\circ}\text{C} \times 1.0\text{h}$ were increased by 5.5% ~ 54.9% and 12.5% ~ 100% than the check of none-thermal treatment respectively. But thermal treatment had no effect on reduce the quantity of bacteria. ③ The quantity of bacteria had significant reduction by adding $75\mu\text{g/mL}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ and $1 \sim 3\mu\text{g/mL}$ penicillin at same time to the isolation medium, and had little effect on the quantity and varieties of actinomycetes. Actinomycetes quantity ($\times 10^6$ cfu/g) and variety of the treating of $75\mu\text{g/mL}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ and $1 \sim 3\mu\text{g/mL}$ penicillin in No. 1 soil on SDSA medium had reductions by 0 ~ 58.8% and 0 ~ 18.2% compared with treating of $75\mu\text{g/mL}$ $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, respectively. ④ streptomycin might not been used for bacteria inhibitor in the isolation of actinomycetes.

Key words: Actinomycetes, Microbial resources, Actinomycete isolation, Medium

放线菌是一类具有重要经济价值和多种用途的微生物。目前从微生物中发现的 8,000 多种微生物活性物质中, 有近 70% 是放线菌产生的^[1]。但是, 目前人们分离到的放线菌仅占土壤中所有放线菌的 10% 左右^[2]。开展大规模放线菌资源调查和建立有效的放线菌分离方法是发现放线菌新种属和新活性物质产生菌的重要途径之一。现有的

* 联系人 Tel: (029) 87092319 (O), E-mail: xueqiong2004@126.com

收稿日期: 2003-02-22, 修回日期: 2003-04-29

放线菌分离培养基多达 30 余种^[3,4], 放线菌资源调查待分离土样数量很大, 培养基种类过多将加大分离工作量, 故筛选几种出菌率高、能将土壤中绝大多数种类放线菌分离培养出的代表性培养基, 可在保证获得绝大部分放线菌资源信息的情况下, 有效减少工作量。此外, 增加可培养放线菌数量和抑制杂菌也是建立放线菌有效分离方法面临的重大问题之一。关于放线菌的分离培养基及杂菌抑制方法姜成林等^[5,6]已进行了许多研究, 但对代表性培养基的筛选、提高可培养放线菌数量及采用理化因子联合抑制杂菌的研究报道不多。本文重点研究了不同培养基上特定土壤样品放线菌的出菌率、放线菌的种类及热处理与化学抑制剂对放线菌分离效果的影响, 旨在寻找适用于放线菌资源研究的代表性培养基、土样预处理方法和化学抑制剂。该研究结果对于待分析土壤样品数量很大的放线菌资源研究有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品: 采自青海省不同肥力的农田土壤, 1、2、3 号土样分别代表低、中、高有机质土。土样基本性质见表 1。

表 1 供试土壤基本性质

土类编号	土类	有机质 (g·kg ⁻¹)	pH	速效养分 (mg/kg)		
				N	P	K
1	灰钙土	11.6	8.00	150	31	361
2	砂土	13.9	7.86	570	93	238
3	黑钙土	48.7	8.38	280	10	163

注: 土壤有机质测定采用重铬酸钾容量法^[7], pH 用 Beckman90 型 pH 计测定

1.1.2 培养基: A 高氏 1 号琼脂培养基^[5], B 黄豆粉琼脂培养基^[5], C 秸秆腐解物琼脂培养基 (称 150g 堆腐至发黑发粘呈半腐解状态、晒干粉碎的小麦秸秆腐解物粉于 1L 自来水中煮沸 30min, 过滤后加 K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, 琼脂 18g, 加水定容至 1L), D 泥炭浸汁琼脂培养基 (称 250g 泥炭于 1L 自来水中煮沸 30min, 过滤后加琼脂 18g, 加水定容至 1L), E 土壤浸汁琼脂培养基^[5], F 燕麦片琼脂培养基^[5], G 腐殖酸琼脂培养基^[5], H 小麦粉琼脂培养基 (称取粉碎小麦 40g 于 1L 水中煮 30min, 过滤后加琼脂 18g, 加水定容至 1L)。

1.2 方法

1.2.1 培养基制备: 分别按 A, B, C, D, E, F, G, H 8 种培养基成分称量, 配制好后 1×10⁵ Pa 30min 灭菌, 冷却至 50℃~60℃按不同处理加入抑制剂倒平板备用。

1.2.2 土样中放线菌分离: 稀释平板涂抹法^[8]分离, 28℃培养 7d。

2 结果与分析

2.1 培养基种类对放线菌分离计数结果的影响

从表 2 可以看出, A 和 C 两种培养基上分离到的放线菌数量及种类均最多, 其数量 (×10⁶ 个/g) 及种类 (种) 分别为 6.2、5.1 和 15、11; B 培养基上分离到的放线菌数量 (×10⁶ 个/g) 最少, 仅为 0.6, 是 A 培养基上分离放线菌数量的 1/10。从 8 种培养基分离的放线菌菌落特征看, A 培养基上分离到的放线菌种类最多, 包括了 B, D, E, F, G, H 6 种培养基上的放线菌种类; G 培养基上的放线菌种类最少 (1 种)。C 培养基

上出现了一些 A 培养基上没有的菌落, 且 C 平板上的菌落几乎全部是链霉菌, 该培养基适于链霉菌属放线菌的分离、测数。从表 2 还可看出, A 培养基上的细菌最少 (仅为 0.5×10^6 个/g), B 和 C 培养基上的细菌数量 ($\times 10^6$ 个/g) 分别高达 68.97 和 58.12, 但 C 培养基平板上的链霉菌对细菌有明显的抑菌圈, 细菌污染对挑取放线菌影响不大。8 种培养基上均无霉菌出现。以上分析表明, A 培养基上放线菌的出菌率高, 放线菌种类亦多, 且细菌干扰少; C 培养基上链霉菌数量和种类均较多, 可将 C 作为链霉菌分离培养基。其他培养基上的细菌较多, 变化在 $(12.7 \sim 68.97) \times 10^6$ 个/g 之间。因此, 用 A、C 两种培养基, 就可以从土壤中分离到绝大部分 (种类和数量) 放线菌; A、C 培养基上的测数结果能充分地反映土壤中的放线菌数量。

表 2 不同培养基上的分离结果 ($\times 10^6$ 个/g)

培养基	放线菌		细菌	霉菌
	总数	种类数 (种)		
A 高氏 1 号琼脂 (GA)	6.2	15	0.51	0
B 黄豆粉琼脂 (SPA)	0.6	10	68.97	0
C 秸秆腐解物琼脂 (SDSA)	5.1	11	58.12	0
D 泥炭浸汁琼脂 (PEA)	2.6	3	46.88	0
E 土壤浸汁琼脂 (SEA)	1.4	4	12.70	0
F 燕麦片琼脂 (OA)	1.8	3	28.10	0
G 腐殖酸琼脂 (HAA)	2.0	1	39.70	0
H 小麦粉琼脂 (WA)	1.0	2	43.10	0

注: 细菌数量为 48h 的测定结果, 表 3、4、5 细菌计数时间与此相同

2.2 热处理对可培养放线菌和细菌数量的影响

在同样的处理时间下, 随着预处理温度升高, 放线菌数量和种类均明显增加, 细菌数量有减少趋势, 说明通过一定温度预处理有利于放线菌孢子萌发, 对细菌生长有一定抑制作用 (表 3)。如 1 号土样经 $1.0\text{h} \times 120^\circ\text{C}$ 处理后放线菌数量 (7.9×10^6 个/g) 和种类 (18 种) 较 $1.0\text{h} \times 100^\circ\text{C}$ 处理的放线菌数量 (7.1×10^6 个/g) 和种类 (15 种) 分别增加了 10% 和 20%。相同温度处理下, 随着处理时间延长, 放线菌数量和种类均呈现先升高、后降低的趋势, 细菌数量稍有减少。如 120°C 下, 1 号土经 1.0h, 1.5h 及 2.0h 处理后放线菌数量 ($\times 10^6$ 个/g) 分别为 7.9、7.4 及 5.1, $120^\circ\text{C} \times 2.0\text{h}$ 处理下的放线菌数量分别比 $120^\circ\text{C} \times 1.5\text{h}$ 和 $120^\circ\text{C} \times 1.0\text{h}$ 处理降低了 55% 和 45%, 即处理时间过长会导致放线菌数量减少。因此, 在分离放线菌前, 采用适当的温度和时间对土样进行预处理可使放线菌孢子活化, 以便获得更多放线菌。但热处理对减少细菌的出菌量效果不理想, 其结果与姜成林^[9]的研究一致。

表 3 热处理条件下的放线菌及细菌的数量 (10^6 个/g)

处 理		1 号土			2 号土			3 号土		
温度 ($^\circ\text{C}$)	时间 (h)	放线菌		细菌	放线菌		细菌	放线菌		细菌
		总 数	种类数		总 数	种类数		总 数	种类数	
(未加热)	0	5.1	11	49.8	4.87	7	33.7	37.17	16	53.34
100	0.5	6.1	11	48.1	4.90	8	33.6	37.29	16	53.00
	1.0	7.1	15	48.0	5.01	11	31.2	38.16	17	52.78
	1.5	6.3	18	47.7	4.88	13	31.1	36.0	18	52.14
	2.0	5.1	14	45.9	4.76	16	27.6	35.33	15	46.1

2.3 化学抑制剂对放线菌分离的影响

从表4可知,3号土样在加75μg/mL和100μg/mL K₂Cr₂O₇ C培养基上,细菌、放线菌数量及放线菌的种类均无明显变化,但100μg/mL K₂Cr₂O₇处理的放线菌菌落显著变小。从表4还可知,在75μg/mL K₂Cr₂O₇与不同浓度青霉素的组合处理中,3种土样在C培养基上的细菌比仅加75μg/mL K₂Cr₂O₇的处理有所减少,其中75μg/mL K₂Cr₂O₇+3μg/mL青霉素处理细菌最少,说明高浓度青霉素对细菌生长有较强的抑制作用,如对1号土而言,在含有75μg/mL K₂Cr₂O₇的C培养基中分别加入3μg/mL、2μg/mL及1μg/mL青霉素时放线菌的数量(×10⁶个/g干土)和种类(种)分别为2.1和9、4.91和11及4.97和11,较仅加入75μg/mL K₂Cr₂O₇的放线菌数量(×10⁶个/g)和种类(种)分别减少了58.8%和18.2%、3.7%和0及2.5%和0;青霉素浓度达3μg/mL时,放线菌数量和种类明显减少,故抑制剂中青霉素浓度不宜过高。

表4 化学抑制剂处理下的放线菌及细菌数量 (10⁶个/g)

No.	抑制剂	土壤编号											
		1号土				2号土				3号土			
		放线菌			细菌	放线菌			细菌	放线菌			细菌
		细菌	种类	菌落(mm)		细菌	种类	菌落(mm)		细菌	种类	菌落(mm)	
1	K ₇₅	5.10	11	5.5	49.8	4.87	7	7.9	33.7	37.17	16	3.9	53.3
2	K ₁₀₀	5.20	10	3.0	58.3	4.91	8	6.2	31.5	36.99	14	2.7	50.0
3	K ₇₅ +P ₁	4.97	11	3.0	48.8	4.88	7	7.7	30.1	34.10	15	3.8	49.9
4	K ₇₅ +P ₂	4.91	11	0.4	43.9	4.56	7	7.3	28.6	33.89	15	3.5	29.7
5	K ₇₅ +P ₃	2.10	9	2.0	39.6	3.11	6	6.5	17.8	20.16	13	3.3	17.4
6	S ₃₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	S ₃₀ +K ₇₅ +P ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	S ₃₀ K ₇₅ +	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	S ₃₀ +K ₇₅	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	S ₃₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	S ₃₀ +K ₇₅ +P ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

注:放线菌菌落大小指皿内主要类群的大小,处理K₇₅、K₁₀₀分别为K₂Cr₂O₇75μg/mL、K₂Cr₂O₇100μg/mL;P₁、P₂、P₃及S₃₀、S₃₀分别指青霉素浓度为1μg/mL、2μg/mL、3μg/mL及链霉素浓度为30μg/mL、50μg/mL

为了加强抑制剂的效果,邹汉玄等在放线菌分离培养基中加入30μg/mL链霉素,后减少了杂菌污染,对放线菌无影响^[6]。本文的研究结果与之相反:在所有加链霉素的培养基中,细菌、真菌及放线菌均未检出(见表4),各处理无一例外。该结果表明,链霉素在抑制细菌、真菌的同时,完全抑制了放线菌生长。其机理在于:链霉素通过抑制蛋白质合成达到抗菌效果。

2.4 化学抑制剂与加热联合处理对放线菌分离效果的影响

化学抑制剂与加热联合处理细菌数量显著减少(表5)。如在处理2中,1号土样无细菌检出,2号和3号土样细菌数量比处理1的细菌检出量分别减少了99.8%和94.3%;比纯加热处理(1.0h×120℃,)的细菌检出量(30.8×10⁶个/g和49.7×10⁶个/g,表3)分别减少了99.85%和96.6%。此外,化学抑制剂与加热联合处理后,放线菌数量和种类较处理1明显增加,而与纯加热处理(1.0h×120℃,表3)相当。如

在处理2中,2号土样的放线菌数量和种类(种)分别为 8.91×10^6 个/g和13,较纯化学抑制剂处理1的放线菌数量(4.56×10^6 个/g)和种类(7种)分别增加了31.4%和28.6%。1号土和3号土与之类似。由此可知,化学抑制剂与加热联合处理能显著增加放线菌的数量和种类,且对细菌有明显的抑制作用。故 $75\mu\text{g/mL K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 + 2\mu\text{g/mL}$ 青霉素与 $1.0\text{h} \times 120^\circ\text{C}$ 联合处理可用于放线菌分离前土样的预处理。

表5 化学抑制剂与加热联合处理下的放线菌及细菌的数量(10^6 个/g)

处 理	土壤编号								
	1号土			2号土			3号土		
	放线菌		细菌	放线菌		细菌	放线菌		细菌
	总数	种类		总数	种类		总数	种类	
1(化学抑制)	4.91	11	43.9	4.56	7	28.6	33.89	15	29.7
2(化学+物理抑制)	5.09	18	0	8.91	13	0.07	53.87	19	1.07

注:1为化学抑制($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $75\mu\text{g/mL}$ + 青霉素 $2\mu\text{g/mL}$)单独使用,2为处理1+热处理($120^\circ\text{C} \times 1.0\text{h}$)联合处理

3 结论

采用高氏1号琼脂(GA)和秸秆腐解物琼脂(SDSA)两种培养基,就可以从土壤样品中分离出绝大部分(种类和数量)放线菌,GA和SDSA两种培养基的分离、测定结果就可以反映土壤中放线菌的基本状况。

$120^\circ\text{C} \times 1.0\text{h}$ 加热预处理土样,有利于放线菌孢子萌发,增加放线菌的数量和种类,但热处理对减少细菌出菌率效果不理想。

在放线菌分离培养基中加入化学抑制剂($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $75\mu\text{g/mL}$ + 青霉素 $2\mu\text{g/mL}$)可使细菌数量显著减少,不影响放线菌数量和种类。

链霉素不能用作放线菌分离时的细菌抑制剂。采用向放线菌分离培养基中加入化学抑制剂($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ $75\mu\text{g/mL}$ + 青霉素 $2\mu\text{g/mL}$)和对土壤样品加热($120^\circ\text{C} \times 1.0\text{h}$)双重处理,细菌数量比纯化学抑制剂和纯加热处理明显减少,放线菌数量和种类较纯化学抑制剂明显增加,与纯热处理相当。

参 考 文 献

[1] 姜成林,徐丽华.工业微生物,1989,19(6):31~35.
[2] 张纪忠,黄静娟,盛宗斗,等.微生物分类学.上海:复旦大学出版社,1985.214~218.
[3] Okami Y. Concepts and techniques for isolation and characterization of actinomycetes. In: STM-TSBA'91 Workshop on Actinomycetes, Madison, 1991, 1~3.
[4] 晋季英,郑 敏.生物学杂志,2000,17(2):16~17.
[5] 程丽娟,薛泉宏,米航线,等.微生物学实验技术.西安:世界图书出版公司,1988.
[6] 邹汉玄,孙定国.果树科学,1994,11(1):19~22.
[7] 文启考.土壤有机质研究法.北京:农业出版社,1984.
[8] 杨宇容,徐丽华,李启任,等.云南大学学报,1994,34(3):241~244.
[9] 姜成林,徐丽华,杨宇容,等.微生物资源学.北京:科学出版社,1997.16~23.