

应用分散和差速离心法分离嗜酸和耐酸链霉菌的试验及评价*

王黎明 黄英 崔庆锋 谢琼 张亚美 刘志恒

(中国科学院微生物研究所国家微生物资源重点实验室 北京 100080)

摘要: 新的微生物资源的开发离不开菌种分离技术的改进和分离效率的提高。我们采用一种新的分离方法——分散和差速离心法 (Dispersion and Differential Centrifugation, DDC), 以传统的振荡法做对照, 对 12 份酸性土壤样品进行了链霉菌的分离。结果表明 DDC 方法的分离效率是传统方法的 2~20 倍, 且选择性好。用 DDC 方法共分离出链霉菌 249 株, 归属于 12 个颜色类群, 其中的 45 株代表菌株的形态和细胞壁类型均符合链霉菌的特征, 最适生长 pH 均为 4.5~5.5。结果表明应用 DDC 方法分离非常见的嗜酸和耐酸链霉菌是可行的。

关键词: 分散和差速离心, 嗜酸链霉菌, 耐酸链霉菌, 分离

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 06-0081-06

ISOLATION OF ACIDOPHILIC AND ACIDODURIC STREPTOMYCETES USING DISPERSION AND DIFFERENTIAL CENTRIFUGATION APPROACH

WANG Li-Ming HUANG Ying CUI Qing-Feng XIE Qiong ZHANG Ya-Mei LIU Zhi-Heng*

(State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology,
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: Technological improvement for microorganism isolation is important since isolation provides substantial materials for the exploitation of new microbial resources. In this study, a new approach, dispersion and differential centrifugation (DDC), was applied in the isolation of acidophilic and acidoduric streptomycetes from 12 acid soil samples. Contrast with traditional method, the new approach yielded satisfying results with 2~20 times isolation efficiency and good selectivity. 45 representatives out of 249 streptomycetes isolates, which belonged to 12 color groups, showed morphology and cell wall type consistent with streptomycetes. The optimum pH range for their growth were between pH 4.5~5.5. It is proved that we succeeded in the rare-streptomycetes isolation using DDC approach.

Key words: Dispersion and differential centrifugation, Acidophilic streptomycetes, Acidoduric streptomycetes, Isolation

链霉菌不仅能产生各种抗生素, 还能产生其它各种蕴藏着巨大社会和经济价值的代谢产物, 如各种酶, 酶抑制剂, 稀有氨基酸, 多糖复合物等等。由于新的种类的微生物的发现往往意味着新的活性物质的发现, 对非常见链霉菌 (rare-streptomycetes) 的分离也就为寻找和发现新的活性物质的提供了机会^[1]。在以往的研究中, 人们对链霉菌的注意力主要集中在中性链霉菌上, 即生长范围在 pH5.0~9.0, 最适酸碱环境为中性的链霉菌。其实, 自然环境中尚存在着其他许多未为人知的链霉菌。最近, 英国 Goodfellow 等人报道了新的链霉菌类群: 生长范围在 pH3.5~6.5, 最适 pH 为 4.5~5.5,

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30270003)

Project Granted by chinese National Natural Science Fund (No. 30270003)

中-英合作研究项目 (Q814)

收稿日期: 2003-02-21, 修回日期: 2003-06-20

在基因进化树上能形成单独的分支的嗜酸链霉菌, 和生长范围在 pH4.5~7.5 之间, 最适 pH 为 4.5~5.5 的耐酸链霉菌。

嗜酸链霉菌在酸性环境中普遍存在, 尤其是在土壤中。它们所产生的几丁质酶和淀粉酶的最适反应 pH 都低于中性链霉菌所产生的酶。其数值分类表型特征也与中性链霉菌有着显著不同。嗜酸性链霉菌是极具潜力的抗真菌素的产生者^[2], 在酸性土壤有机物的代谢循环中起着非常重要的作用^[3]。因此, 分离嗜酸链霉菌, 研究嗜酸链霉菌的生态, 对于寻找和发现天然产物有相当大的意义。

然而, 在天然产物的筛选过程中所使用的大多是沿袭了很久的传统技术, 如直接洒土法, 平板系列稀释法等等。长期的沿用和不加创新, 造成了分离菌种的种类单一, 效率不高, 重复分离过多, 严重地影响和制约了新的生物活性物质的筛选。

链霉菌有着发育良好的菌丝体, 作为优势菌群定居在土壤中, 与土壤有着这样或那样的作用。一方面土壤颗粒的集结会把微生物包裹在里面, 分离的时候接触不到培养基表面, 不能生长, 于是无法分离出来; 另一方面, 发育良好的菌丝体又增加了土壤颗粒集结的力度, 使土壤颗粒更加不易分散。只有打破土壤团粒, 将颗粒内与之胶联的菌丝体释放出来, 才能使土壤和菌体均匀地分散到溶液中去。科学家们为提高放线菌天然产物的筛选效率, 开展了从自然生态环境中选择性分离放线菌的分离技术的研究。曾经采用的方法有缓冲液稀释法, 整合树脂法, 分选法^[4]和超声波法。本实验结合了以上各方法的主要特点, 采取了一个综合的土样处理过程, 称为分散和差速离心法 (Dispersion and Differential Centrifugation, DDC)^[5]。在这一方法中, 综合运用物理和化学手段, 如混合振荡、温和超声波处理、化学震惊等不同程度不同方式地破坏土壤团粒的聚集, 使微生物释放出来, 通过细度分选分步收集、接种, 将土壤中混生着的微生物有效的分离出来^[6,7]。该研究通过对酸性土壤中嗜酸和耐酸链霉菌的选择性分离实验, 来评价 DDC 方法的实用性。

1 材料与方法

1.1 土壤样品来源、酸碱度和植被情况

见表 1。

表 1 土壤样品来源、酸碱度和植被情况 (采集时间 2002 年 7 月)

土样	采土地点	植被	pH
1	江西瑞昌市武山铜矿矿石堆脚部土壤	杂草	3.47
2	共青城胡耀邦墓地下侧松林土壤	马尾松	3.97
3	江西农大校园自然林地茶树根部土壤	油茶林	4.47
4	江西农大校园天然针叶林土壤	黑松	4.23
5	江西省安福县西坑林场牛角冲杉树林地	杉木人工林	3.24
6	江西安福县陈山林场罗泥坑杉木林地土壤	杉木人工林	4.24
7	共青城胡耀邦墓下游 50 米自然针叶林地	马尾松	4.80
8	共青城胡耀邦墓地后面 10 米处自然松林土壤	马尾松	4.7
9	武山铜矿矿石堆下茅草根部分土壤	酸腐死亡茅草根部分土壤	4.47
10	武山铜矿矿石堆酸水池矿坑边冬芒草根部分土壤	冬芒	3.66
11	马鞍山 垵东北	草根	4.0
12	马鞍山 坝顶植树坑	裸土	2.0

1.2 选择分离培养基的配制

1.2.1 配制二倍浓度的培养基成分: D-蔗糖 10g, L-谷氨酸 1g, L-天冬氨酸 1g, MgSO₄·

7H₂O 0.05g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, CaCO₃ 0.02g, K₂HPO₄ 2g, Agar 25g, 水 500mL。

1.2.2 配制不同 pH 值的缓冲液: 见表 2。

1.2.3 将二倍浓度培养基与缓冲液分别灭菌后按 1:1 混合, 加入过滤除菌的抗真菌剂 Nystatin 和 Cycloheximide, 二者终浓度均为 50ug/mL。

1.3 分离方法

1.3.1 分散和差速离心法 (Dispersion and Differential Centrifugation): 称取 1g 土样, 加入 10mL 胆酸钠 (0.1% w/v), 10mL 螯合树脂

(Na 型, Sigma) 和 10 颗左右玻璃珠, 震荡 30min, 500g 离心 1min。将上层土壤悬液转移至另一干净管 (1) 内, 下层土壤沉淀加入 10mL 冷的 0.05 mol/L Tris 缓冲液 (pH7.4), 震荡 30min, 500g 离心 1min, 将上层土壤悬液合并入管 (1) 内, 得到第 1 步土壤处理液。

下层土壤沉淀加入 10mL 胆酸钠 (0.1% w/v), 低功率超声波水浴温和处理 1min, 再加入 10mL 胆酸钠 (0.1% w/v), 震荡 30min。500g 离心 1min。将上层土壤悬液转移至管 (2) 内; 加入 10mL 冷的 0.05mol/L Tris 缓冲液 (pH7.4), 震荡 30min, 500g 离心 1min。将上层土壤悬液合并至管 (2) 内, 得到第 2 步土壤处理液。将剩余小颗粒沉淀重新悬浮在 40mL 冷水中, 震荡 30min, 得到第 3 步土壤处理液。

将 3 部分土壤处理液均于 5000g 离心 20min, 弃上清, 沉淀物分别重新悬浮于 10mL 生理盐水, 做 10⁻¹ ~ 10⁻⁴ 系列稀释, 每个稀释度各取 0.2mL 接种分离平板。

1.3.2 传统分离方法: 称取土样 1g, 加入 30mL 无菌水, 摇床振荡过夜。系列稀释, 平板涂布接种。

1.4 孢子悬液制备

在 1.5mL 离心管中装入 20% 的甘油 700uL 和少量棉絮, 高压灭菌。从生孢良好的平板上刮取一整环孢子, 放入装有棉絮和 20% 甘油的离心管内。涡流振荡混合 5s。用棉絮过滤, 小心缓慢地把悬液转移至另一干净的 1.5 mL 离心管内, 得到均一的孢子悬液, 孢子浓度大约为 1 × 10⁶。从中取 5uL 做相关测定接种之用, 剩余孢子悬液 - 20℃ 保藏。

1.5 嗜酸链霉菌的初步检验

根据嗜酸和耐酸链霉菌的 pH 生长范围, 对分离株做 pH 梯度生长实验。最适生长为 pH4.5 ~ 5.5 的链霉菌被初步认定为嗜酸链霉菌。

在 pH 梯度测定中, 使用 5 个不同的 pH 梯度值: 3.5, 4.4, 5.5, 6.5 和 7.5。每株测试菌各取 5uL 孢子悬液点种到不同 pH 值缓冲液的培养基上。28℃ 平板培养 3 周。2 ~ 3 周后记录生长情况, 各计两个重复。

1.6 颜色类群

根据阎先生的链霉菌分类法^[8]将所有分离株按气丝、基丝和孢子的颜色归类。

1.7 形态观察

插片法观察菌丝形态^[9]。

表 2 100mL 溶液体系中, 配制不同 pH 值缓冲液所需要的溶液量

pH	0.1mol/L 柠檬酸	0.2mol/L 磷酸氢二钠
3.5	69.75	30.25
4.5	54.57	45.43
5.5	43.13	56.87
6.5	29.04	70.96
7.5	7.62	92.38

1.8 细胞壁氨基酸组分的测定

按照 Hasegawa^[10]的方法对代表株进行细胞壁氨基酸分析,嗜酸链霉菌须含有 LL-DAP。

1.9 特异引物 PCR 检测

用嗜酸链霉菌的 16S rDNA 序列的特异引物进行 PCR 扩增,反应呈阳性结果的为嗜酸链霉菌。

1.10 菌种保藏

20%甘油于 -20℃ 冷冻保藏或冻干法保藏。

2 结果

2.1 分离效果

取 DDC 方法中 3 个不同程序的土壤处理所得到的土壤悬液和作为对照的传统方法所得到的土壤悬液,分别在 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 或 10^{-4} 稀释度下,接种 0.2 mL 土壤悬液到选择分离平板上,28℃ 下培养 2 周后观察结果。 10^{-2} 或 10^{-3} 稀释度接种的平板上,菌落生长数量适中,故以 10^{-2} 或 10^{-3} 稀释度接种的平板上生长的菌落数做数量统计,数据见表 3。

DDC 方法处理的分离平板上细菌污染少,放线菌生长丰富,并形成清晰的单菌落,可作为分离嗜酸链霉菌的适宜手段。而传统分离法的分离平板上细菌污染严重,可见的放线菌菌落很少,无法成功地分离嗜酸链霉菌。

2.2 采用 DDC 方法

共分离出具有链霉菌属形态的放线菌 249 株,按颜色类群分为:白孢类群 38 株,淡紫灰类群 9 株,粉红孢类群 45 株,弗氏类群 6 株,黄色类群 57 株,灰褐类群 13 株,灰红紫类群 16 株,金色类群 7 株,烬灰类群 51 株,绿色类群 2 株,球孢类群 1 株,吸水类群 4 株。从 12 个颜色类群中选取代表菌株共 45 株进一步分析。

2.3 pH 梯度试验

所有代表菌株最适生长都在 pH4.5 ~ 5.5,在 pH7.5 不生长的有 3 株,在 pH7.5 微弱生长的有 13 株,在 3.5 微弱生长的有 4 株,菌株编号为 32214、33214、42301、53108。说明我们成功地分离到一批嗜酸和耐酸链霉菌。

2.4 形态观察

大部分分离株具有气丝,弯曲或螺旋的孢子丝,基内菌丝不断裂。符合链霉菌形态特征。

2.5 细胞壁氨基酸组分析

所有的代表菌株都含有 LL-DAP,细胞壁 I 型,与链霉菌细胞壁类型一致。

2.6 特异引物 PCR

选择 28 株进行嗜酸链霉菌特异引物 PCR,有 2 株分离株的 PCR 产物凝胶电泳检测呈阳性,菌株编号为 32214 与 33214,确定为嗜酸链霉菌。其它为耐酸链霉菌。

表3 从各土样不同部分的土壤悬液和对照中分离到的微生物数量统计

土样/植被/pH值	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Control	DDC与对照放线菌分离效率的倍比
1号 杂草 pH 3.47	10^{-2} 无可见菌落	10^{-2} 诺卡氏菌 1个	10^{-2} 真菌 3个	10^{-2} 无可见菌落	1/0
2号 马尾松 pH 3.97	10^{-2} 细菌 20个	10^{-2} 真菌 4个 细菌 18个 放线菌 16个, 5种	10^{-2} 真菌 1个 细菌 98个	10^{-2} 细菌污染严重, 放线菌 6个	2.7
3号 油茶林 pH 4.47	10^{-3} 细菌 1个	10^{-3} 真菌 2个 细菌 0个 放线菌 9个, 6种	10^{-3} 真菌 2个 细菌 8个 放线菌 12个, 8种	10^{-3} 细菌 45个 放线菌 9个	2.3
4号 黑松 pH 4.23	10^{-3} 放线菌 1个	10^{-3} 真菌 0个 细菌 1个 放线菌 8个, 2种	10^{-3} 真菌 1个 细菌 23个 放线菌 18个, 4种	10^{-3} 细菌 160个 放线菌 3个	8.7
5号 杉木人工林 pH 3.24	10^{-2} 真菌 2个 细菌 5个 放线菌 5个	10^{-2} 真菌 4个 细菌 2个 放线菌 19个, 5种	10^{-2} 真菌 1个 细菌 17个 放线菌 36个	10^{-2} 细菌污染严重 放线菌 3个	20
6号 杉木人工林 pH 4.24	10^{-2} 真菌 0个 细菌 0个 放线菌 52个	10^{-2} 真菌 0个 细菌 0个 放线菌 40个	10^{-2} 真菌 0个 细菌 0个 放线菌 24个	10^{-2} 细菌生长很多 放线菌 80个	1.5
7号 自然针叶林 pH 4.80	10^{-3} 无可见菌落	10^{-3} 无可见菌落	10^{-3} 真菌 2个 细菌 3个 放线菌 16个	10^{-3} 真菌 1个 放线菌 10个	1.6
8号 马尾松 pH 4.7	10^{-3} 真菌 8个 细菌 52个 放线菌 0个	10^{-3} 真菌 2个 细菌 0个 放线菌 1个	10^{-3} 真菌/细菌污染 放线菌 0个	10^{-3} 真菌 3个 细菌众多 放线菌 3个	0.3
9号 酸腐茅草根 pH 4.47	10^{-2} 真菌 1个 细菌 0个 放线菌 0个	10^{-2} 真菌 3个 细菌 0个 放线菌 0个	10^{-2} 真菌 2个 细菌 1个 放线菌 2个	10^{-2} 真菌 1个	2/0
10号 冬芒 pH 3.66	10^{-3} 无可见菌落	10^{-3} 真菌 0个 细菌 0个 放线菌 1个	10^{-3} 真菌 13个 放线菌 3个	10^{-3} 真菌 3个 放线菌 3个	1.3
11号 草根 pH 4	10^{-3} 无可见菌落	10^{-3} 真菌 22个	10^{-3} 真菌 82个	10^{-3} 真菌 43个	
12号 无植被 pH 2	10^{-2} 无可见菌落	10^{-2} 真菌 2个	10^{-2} 真菌 9个	10^{-2} 真菌 2个	

3 讨论

通过对 12 份酸性土壤样品采用不同方法分离链霉菌的效果的对比,可以看出,在土样 2、3、4、5、6、7 的处理中,DDC 方法的分离效率是传统方法的 2.7 倍,2.3 倍,8.7 倍,20 倍,1.5 倍,1.6 倍,说明 DDC 方法能够比较显著地提高土壤放线菌的分离效率。其余土样由于生态贫瘠,未检测到可培养的放线菌。实验还表明,大部分的放线菌分离自第二部分或第三部分的土壤悬液中。这和弱超声波作用打断了一些土壤团粒的聚集,使菌体能更好地分散到溶液中有关系。且脂肪酸钠、Tris 缓冲液与蒸馏水交替作用,去垢剂的表面活性作用与离子强度的化学震惊消除了土壤团粒的静电作用和微生物与土壤之间吸附,使土壤团粒更容易被打散,也使菌体能够更多地从与土壤集结状态分散到溶液中去。根据壤团粒的聚集的强度不同,在不同程度上破坏这种聚集,分步收集土壤悬液,可以使与土壤聚集程度不同的菌分散到不同部分的土壤悬液中去。而在传统方法中,由于各类型的菌没有分开,细菌与其它菌混在一起,往往由于细菌本身的生长过快,而掩盖或抑制了其它类菌的生长,造成细菌污染,致使分离效果不理想。真菌大多发现于第二部分土壤悬液中,也有的分离于第三部分(数据略),究其原因,也是由于真菌的菌丝体更为丰富,多与土壤团粒纠结在一起,在超声波打散土壤团粒后才被释放出来。虽然这同时也造成了 DDC 方法中真菌污染比对照中要多,但其生长数量很少,且在抑真菌剂的作用下生长不旺盛,因此对放线菌的分离一般不会造成影响。

应用 DDC 方法,分离出 249 株链霉菌,经 pH 梯度生长实验、形态观察和细胞壁氨基酸分析,初步认为是嗜酸链霉菌或耐酸链霉菌类群,按颜色分别归类于白孢类群、淡紫灰类群、粉红孢类群、弗氏类群、黄色类群、灰褐类群、灰红紫类群、金色类群、烬灰类群、绿色类群、球孢类群、吸水类群等十二个不同类群。使用嗜酸链霉菌 16S rDNA 特异性探针检查,发现 2 株属于嗜酸链霉菌属的新的分类单位(另文报道)。

实验结果表明,在酸性土壤的链霉菌的分离中,应用 DDC 方法分离到的链霉菌数量多,种类丰富,细菌污染少。因此,DDC 方法是一种适用于土壤链霉菌分离理想方法。

致谢 承蒙英国 Newcastle 大学 Goodfellow 教授给予本实验许多指导,江西农业大学高勇生教授惠赠酸性土壤,在此表示感谢。

参考文献

- [1] 刘志恒. 现代微生物学, 北京: 科学出版社, 2002.
- [2] Park Y H, Yim D G, Kim E, *et al.* J Gen Microbiol, 1991, **137**: 2265 ~ 2269.
- [3] Goodfellow M, Williams S T. Ann Rev Microbiol, 1983, **37**: 189 ~ 216.
- [4] Hopkins D W, O' Donnell A G, MacNaughton S J. Soil Biol Biochem, 1991b, **23**: 227 ~ 232.
- [5] Atalan E, Manfio G P, Ward A C, *et al.* Antonie van Leeuwenhoek, 2000, **77**: 337 ~ 353.
- [6] Hopkins D W, MacNaughton S J, O' Donnell A G. Soil Biol Biochem, 1991a, **23**: 217 ~ 225.
- [7] MacNaughton S J, O' Donnell A G. J Microbiol Meth, 1994, **20**: 66 ~ 97.
- [8] 阎逊初. 放线菌分类与鉴定, 北京: 科学出版社, 1986.
- [9] 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯, 等. 放线菌研究及应用, 北京: 科学出版社, 1990.
- [10] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. J Gen Appl Microbiol, 1983, **29**: 319 ~ 322.