

土壤放线菌区系研究用的分离方法*

姜 成 林 徐 丽 华

(云南省微生物研究所,昆明)

放线菌区系研究是放线菌资源开发的重要组成部分和先导。如何将土样中的放线菌都尽可能分离出来是一个老而又未完全解决的问题。由于条件的限制,样品采集以后不能立即进行分离,样品存放过程是否对放线菌的组成产生影响?我们就此进行了试验,现报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 放线菌分离培养基

高氏合成一号琼脂、甘油门冬酰胺琼脂、甲壳素琼脂^[1]、改良水解酪素琼脂(水解酪素 2g;葡萄糖 2g; NH_4SO_4 2.64g; K_2HPO_4 5.65g; KH_2PO_4 2.38g; 酵母膏 0.1g; CoCl_2 0.01g; $\text{NaB}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0.1g, 微量盐溶液^[2] 1ml; 放线酮 50mg; 制霉菌素 50mg; 利富平 5mg; 琼脂 20g; 水 1000ml. pH7.2) 及甘油精氨酸琼脂(甘油 5g; 精氨酸 0.5g; 葡萄糖 1g; K_2HPO_4 0.3g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g; NaCl 0.3g; 核黄素 0.5mg; 生物素 0.25mg; 菸酸 0.5mg; 肌醇 0.5mg; 微量盐溶液^[2] 1ml; 放线酮 50mg; 制霉菌素 100mg; 青霉素 0.8mg; 多粘菌素 4mg; 琼脂 20g; 水 1000ml. pH7.2)。所有维生素、抗生素均照文献 2 的方法分别消毒。

(二) 土样来源、保存及分离方法

1984 年 4 月 4 日从昆明郊区森林、稻田和菜园采集五种植被的土样,两小时后用上述五种培养基作平板稀释,28℃ 培养 14 天分离放线菌。同时将各类土样一分为二,分别装入纸袋,于室温(15—20℃)及冰箱(0—4℃)保存 10 天、20 天后再用甘油门冬酰胺琼脂分离放线菌。1984 年 12 月 11 日又采集森林土 5 份,两小时内用甘油门冬酰胺琼脂+50ppm 重铬酸钾

作平板稀释[参照任守让等:一种土壤放线菌计数法(会议资料)],28℃ 培养 14 天,对放线菌、细菌、真菌进行计数。用营养琼脂于采样当天(2 小时后),10 天及 20 天作平板稀释,28℃ 培养 36 小时后作细菌记数。

(三) 放线菌分类鉴定

采用国内通用的方法。

结 果 和 讨 论

(一) 五种培养基的分离结果

表 1 是采样当天用五种培养基分离放线菌的结果。甲壳素琼脂和高氏合成一号琼脂分离的放线菌数量最多。改良水解酪素琼脂及甘油精氨酸琼脂分离的放线菌较少。就分离到的放线菌类群而言,甘油精氨酸琼脂分离的最多,有 6 个属,其次是甘油门冬酰胺琼脂和高氏合成一号琼脂。甲壳素琼脂分离到的小单孢菌较多,改良水解酪素分离马杜拉放线菌较好。

(二) 土样保存过程中各类微生物的变化

表 2 的结果可以看出,土样存放 10 天,放线菌还略有增加,稀有放线菌的变化较大,但总的来说,在 20 天以内,放线菌(尤其是链霉菌)的数量无明显变化。在相同的保存时间内,低温保存,放线菌的数量较少。水田土样的情况比较特殊,在室温下随着时间的延长,细菌数量逐次减少,放线菌的检出率随之增加,而低温保存的土样,细菌数量减少不多,放线菌的出菌率也增加不多。

为了进一步弄清土样保存过程中细菌的数量变化,于 1984 年 12 月采集森林土作了细菌计数(表 3)。结果表明,室温保存 10 天,细菌

* 本课题由中国科学院科学基金会资助。

表 1 不同培养基的分离结果 ($\times 10^4$ /克干土)

培养基 \ 属	链霉菌	小单孢菌	游动放线菌	马杜拉放线菌	原小单孢菌	诺卡氏菌	总 数
高氏无机一号琼脂	55.76	3.53	0.58	0.90		1.3	62.07
甘油-门冬酰胺琼脂	50.70	2.35	0.30	1.18		4.4	58.93
甲壳素琼脂	57.55	4.25		0.60		0.3	62.70
改良水解酪素琼脂	21.10	1.88		1.78			24.76
甘油-精氨酸琼脂	24.48	1.78	0.60	0.60	0.3	5.7	33.46

表 2 土样不同存放时间及存放温度对放线菌数量 ($\times 10^4$ /克干土) 及组成的影响

土样存放时间(天)	土样存放温度	链霉菌	小单孢菌	游动放线菌	马杜拉放线菌	诺卡氏菌	未鉴定	总 数
0		50.70	2.35	0.30	1.18	4.40		58.93
10	室温	67.73	6.50	1.08	0.88	7.25		83.44
	0—4℃	59.15	3.25	0.30		1.18	0.58	64.46
20	室温	56.23	4.85	0.40	0.88	2.65	0.60	65.61
	0—4℃	53.58	0.60		0.88	2.75	0.60	58.41

仅存活 12.2%，保存 20 天，仅存活 0.5%。

造成上述现象的一个重要因素可能是土样的水分状况。我们曾经将土样密封于塑料袋中室温保存两个月，其细菌数量几乎没有减少，很难分离放线菌。Cross^[3] 曾经指出，细菌对干燥比较敏感，而放线菌（尤其是孢子放线菌）比较耐干燥，建议采用风干土样两周及干燥琼脂表面以降低细菌数量，增加放线菌的出菌率。

为了增加放线菌的出菌率，解决分离过程中各类微生物的矛盾，在培养基中加入 50ppm 的重铬酸钾是一个简便易行的方法（表 4）。它能大大降低细菌、真菌的数量，提高放线菌的出菌率，而且平板清爽，很好挑菌（图 1）。

根据上述结果，我们认为，为了尽可能分离到土样中的各类放线菌，可用甘油门冬酰胺琼脂或高氏合成一号琼脂分离大部常见链霉菌及部分稀有放线菌，用甘油精氨酸琼脂结合土样的高温预处理来分离马杜拉放线菌、链孢囊菌

及高温放线菌。还可以用阎逊初等^[4]的方法分离高温放线菌，用 Nonomura 等^[5]及 Makkar 等^[6]的方法分离游动放线菌，用 Nonomura 等^[7]的方法分离马杜拉放线菌。并在培养基中加入 50ppm 的重铬酸钾，结合土样的风干处理都有利于放线菌的分离。

表 3 不同保存时间对细菌存活数量 (10^4 /克干土) 的影响

土样保存时间 \ 样品号	2 小时	10 天	20 天
1	3730	8	0
2	2600	603	23
3	50530	5030	150
4	24270	2690	43
5	7160	2430	193
平 均	17658	2152.2	81.8
存 活 %	100	12.2	0.5

营养琼脂平板，土样稀释 10^{-2} ， 10^{-4} ，每稀释三皿，土样室温纸袋保存

表4 培养基加重铬酸钾分离放线菌 (10^4 /克干土) 的效果

样品号	门冬酰胺琼脂(对照)			门冬酰胺琼脂+50ppm重铬酸钾		
	放线菌	细菌	真菌	放线菌	细菌	真菌
1	219	∞	5	301	98	0
2	474.5	∞	0	540	80	0
3	10	1900	2	122	110	0
4	310.5	∞	7.5	493.5	86.5	0
5	98	∞	3	104	66.5	0
平均	222.4		3.5	312.7	88.2	0

采样2小时后分离,土样稀释 10^{-3} ,各3皿

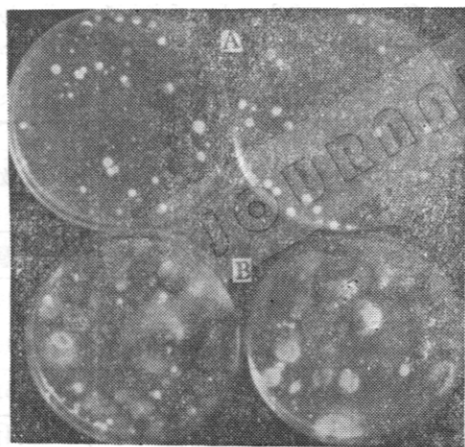


图1 A: 门冬酰胺琼脂+50ppm 重铬酸钾
B: 门冬酰胺琼脂

参 考 文 献

- [1] Hsu, S. C. and J. L. Lockood: *Appl. Microbiol.*, **29**: 422—426, 1975.
- [2] Shirling, E. B. and D. Gottlies: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**: 313—340, 1966.
- [3] Cross, T.: *Dev. Indust. Microbiol.*, **23**: 1—18, 1982.
- [4] 阎逸初、卢运玉: *微生物学报*, **15**: 282—291, 1975.
- [5] Nonomura, H. and S. Takagi: *J. Ferment. Technol.*, **55**: 423—428, 1977.
- [6] Makkar, N. S. and T. Cross: *J. Appl. Bacteriol.*, **52**: 209—218, 1982.
- [7] Nonomura, H. and Y. Ohara: *J. Ferment. Technol.*, **49**: 904—912, 1971.