

毛细管束法分离土壤稀有放线菌

连云鹏 刘兴荔

(广西农学院, 南宁)

摘要 描述了一种改进的从土壤中分离稀有放线菌的毛细管法。本法能在较低的稀释条件下, 利用放线菌孢子和孢囊的疏水性、游动孢子在水中的运动性和趋化性(包括趋氧性)。从而大大提高稀有放线菌的检出率。

关键词 毛细管; 趋化性; 疏水性; 放线菌

土壤微生物学的实践表明, 放线菌在很大程度上可以孢子形式存在。通常, 平板计数的数字幅度为每克土 10^5 — 10^8 个。尽管如此, 用土壤稀释法在琼脂平板上, 常常只有少数优势属的一些种的菌落出现。链霉菌属的菌株在大多数琼脂平板上占放线菌菌落的 70—90%; 其次是占 10—30% 的诺卡氏菌属的菌株; 小单孢菌属的菌株占第三位^[1]。除此之外, 其它放线菌属的菌株数量很少。野野村英夫等对日本几个土壤的研究表明, 小双孢菌属和高温单孢菌属的菌株每克土少于 10^3 个^[2,3]。

稀有放线菌, 或一些用常规分离方法难于发现的罕见菌株, 常因过高稀释而淘汰。而降低稀释度又难于控制细菌的出菌率, 或因真菌出现而妨碍放线菌的分离。为了从土壤中分离出更多的稀有放线菌, 不少学者作了可贵的努力。

Palleroni^[4] 设计出一种趋化性分离游动放线菌科菌株的方法, 取得了满意结果。本文报道一种改进帕氏法——毛细管束法——分离稀有放线菌的技术。

(一) 器具和操作步骤

1. 土壤样品在室内自然风干, 磨碎, 过 80 目筛, 直接分离或 $120^\circ\text{C}/1$ 小时处理再分离。大约 200mg 土样放入 5ml 的灭菌烧杯中, 并在其中立放灭菌的第一只钢圈(高 10mm, 内径 6

mm, 外径 8mm 的不锈钢圈), 用 5ml 灭菌吸管吸取无菌水, 从钢圈中央逐滴滴入, 至水面刚超出钢圈上部端面。用一只 50ml 灭菌烧杯口向下罩住 5ml 烧杯, 28°C 保温 1 小时, 使放线菌孢子悬浮, 或释放活化而运动(图 1-左)。

2. 在第一只钢圈上, 同心立放第二只钢圈, 并从其中央逐滴滴入无菌水, 至水面超出其上部端面 2mm 左右。把长约 2cm、直径约 1cm(由大约 50 根, 每根内径约 1mm 的毛细管捆扎而成)、一端平齐的灭菌毛细管束浸没在经灭菌的 0.01M KCl 水溶液中, 使毛细管为

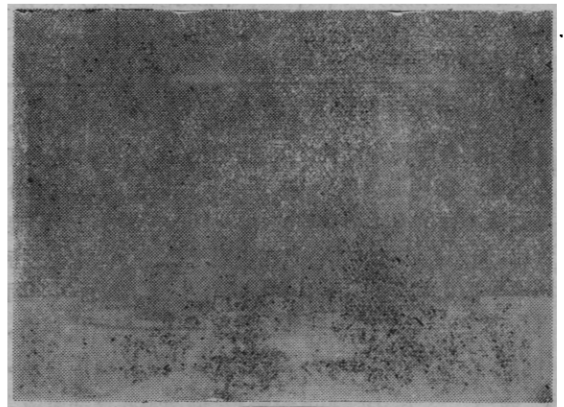


图 1 毛细管束法分离稀有放线菌的装置

左: 土样第一次加水悬浮, 28°C 保温 1 小时

右: 土样第二次加水悬浮, 28°C 继续保温 1 小时

中国科学院科学基金资助项目。

KCl 溶液充满。取出毛细管束，让平齐的一端立放在第二只钢圈上部端面上，罩回 50ml 烧杯，继续 28℃ 保温 1 小时，使上浮或运动的孢子进入毛细管(图 1-右)。

3. 用灭菌镊子夹住毛细管束，分别在燕麦粉-酵母膏-土壤浸出液琼脂^[5]平板和葡萄糖-蛋白胨-土壤浸出液琼脂^[6]平板上点样。通常，每一毛细管束可点样 4 皿，即每种琼脂平板各点二皿。点样时，只需将毛细管束平齐的一端在平板表面触碰一下，使悬液落在平板上即可。从第一至第四皿点样次数可逐皿递增，尽量使悬液均匀地落在各平板上。

4. 用灭菌玻璃刮铲涂抹平板，使悬液展开分布均匀。将平板置 28℃ 或 50℃ 温箱中培养，可分别分离中温性和高温性的放线菌。

(二) 结果和讨论

近四年来，我们采用毛细管束法分土 935 份。分离得到并鉴定出放线菌目的新属新种两个^[7,8]，以及分别属于 10 多个属的稀有菌株一批(图版 I)。此外，还分离得到具有复杂生活循环的罕见原核有机体两群，共 10 个菌株。

这种技术的效果是满意的。探讨这种效果的原因是有趣的，它的可能解释是：

1. 协调解决了土壤中稀有放线菌数量少，稀释倍数高，出菌机率低的矛盾。本法在土样在较低稀释倍数 ($W/V = 1/20$) 下，使稀有放线菌的孢子得以浓缩，加上两种适合于不同科属放线菌生长培养基的配合使用，从而使稀有放线菌的出菌率大为提高。

2. 充分利用了放线菌孢子和孢囊表面的疏水性、游动孢子在水中的运动性和趋化性(包括趋氧性)。滴加无菌水产生的冲力，水的浮力和稀释作用，促使放线菌孢子释放，上浮或运动，并在含有 KCl 等渗溶液的毛细管中得以富集。

当然，任何一种方法都不可能是完美无缺的。本法的缺点在于，还不能有效地控制细菌和真菌的出菌率。因此，在运用本法时，辅以其它措施，如在分土培养基中加入抑制细菌生长的物质(我们常在分土培养基中加入呋喃西林，使每毫升培养基达到 50ppm 的浓度)，或对土样进行热处理等，效果更好。值得一提的是，几经热处理的土样，对提高小单孢菌、小双孢菌和链孢囊菌的出菌率较为明显，但对具有游动孢子放线菌的出菌却不利。似乎放线菌的游动孢子不能耐受 120℃/1 小时的处理。

参 考 文 献

- [1] M. 亚历山大:《土壤微生物学导论》，24—28，科学出版社，1983。
- [2] Nonomaura et al.: *J. Ferment. Technol.*, **49**: 887—894, 1971.
- [3] Nonomaura et al.: *J. Ferment. Technol.*, **49**: 895—903, 1971.
- [4] Norberto J. Palleroni: *Arch. Microbiol.*, **128**: 53—55, 1980.
- [5] 野野村英夫等:《发酵工学会誌》, **57**(2): 79—85, 1979.
- [6] 野野村英夫: 日本放线菌研究会会報 No. 39, pp. 3—10, 1981.
- [7] 连云鹏等:《微生物学报》, **25**(3): 194—196, 1985.
- [8] 刘兴磊等:《微生物学报》, **26**(1): 7—10, 1986.