

专论与综述

粘细菌的分离与纯化

李越中 李 健

(山东大学微生物研究所 济南 250100)

粘细菌 (Myxobacteria) 是尚未得到应有重视的微生物资源。粘细菌分离纯化的困难和方法的特殊性使其研究受到限制。此外,粘细菌在常用的培养基如营养肉汤培养基上不能生长或生长很弱也使它们容易被“埋没”。然而,粘细菌作为一类较特殊的单细胞微生物类群,在生物的发育分化研究中是很好材料^[1,2];在生物活性物质合成方面,由于粘细菌的抗生素产生菌比例高于放线菌,某些粘细菌类群如纤维堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*) 甚至高达近百分之百,并且能够代谢产生许多全新结构的抗性物质^[3,4]而渐被重视;粘细菌丰富的胞外粘液质和特殊的酶蛋白等^[5,6],也具有极好的应用价值;在粘细菌分子生物学基础研究中发现了与 RNA 联系的多拷贝单链 DNA^[7]和两种反转录酶^[8],吸引了更多人的兴趣。有关粘细菌的研究资料大部分来自纯化和培养都简单的黄色粘球菌 (*Myxococcus xanthus*)^[9,10] (文献检索自 1983 年至 1996 年的近千篇有关粘细菌的文献约 80% 是以此菌为研究材料的),目前分类地位已明确的粘细菌也仅 40 余种^[11]。

粘细菌是一类可滑动运动的单细胞革兰氏阴性杆菌。在一定的环境条件下,粘细菌的营养细胞可聚集并形成子实体结构——由坚硬度不同的粘液和粘孢子组成的简单或复杂休眠体。根据“食性”的差异可简单地划分粘细菌为两个生理类群:溶细菌群和溶纤维素群。两者的营养生理条件差异显著。溶纤维素群已确认的只有一个属一个种,即纤维堆囊菌 (*Sorangium cellulosum*),但该种包含许多生理生化性质不同的菌株^[11]。

分离纯化粘细菌一直没有很好的特异而简单的方法^[12]。在《伯杰氏细菌鉴定手册》第八版中粘细菌分类鉴定的主要依据之一仅是植物标本室的子实体标本形态,许多粘细菌没有纯菌株。此后经过 Reichenbach 等人的不断努力^[13],已能根据不同粘细菌的性质,采取特

异的处理方法,获得了目前已分类的 12 属 (《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版及文献 13) 中大多数粘细菌的纯培养。但粘细菌的分类主要依据仍然只是形态学上的特征,如营养细胞、粘孢子、子实体、菌落 (swarms) 等,此外, G + C 百分含量、16s RNA 的同源性和脂肪酸的类型对分类地位的确定也有很大帮助。

与一般细菌的分离纯化相比较而言,粘细菌的分离纯化是非常烦琐和费时的,如纤维堆囊菌 (*S. cellulosum*) 的分离、纯化一般需要 1~2 年的时间。改进粘细菌分离纯化的方法是非常迫切的。

1 粘细菌的自然生境

粘细菌广泛存在于各类土壤中,每克土约含 10^3 到 10^6 个粘细菌^[11],此外在动物粪便,尤其是草食性动物的粪便,活树皮以及腐败的植物上也很多见。尽管某些粘细菌在非土壤基质上更易于分离 (见表 1),但一般在相同环境的土壤中可分离到相同的粘细菌^[13]。由于几乎所有的粘细菌都是食菌性的,因而可被土壤中丰富的微生物群落吸引而形成次生菌群^[14]。草食动物的粪粒是几乎所有粘细菌生长的良好基质,研究表明粪粒上丰富的粘细菌是从周围的土壤中聚集的,但粘细菌的孢子也可以通过动物的肠道而生存下来。粪粒中并不存在粘细菌生长的依赖性因子^[13],粘细菌的聚集可能仅仅反映了粪粒中富含微生物群落和尚未完全降解的植物碎片。腐木和树皮对于某些粘细菌,如堆囊菌 (*Sorangium* spp.) 是很好的生长基质。粘细菌在不同树种上的分布有明显的差异^[13],一般要求树皮和腐木中的树脂和丹宁含量低,但不存在粘细菌生长依赖的树木。

由于粘细菌孢子和子实体具有很强的抗逆性,在不能生长的环境,如海水、酸性泥沼、低氧条件、极地温

国家自然科学基金资助项目

1996-02-29 收稿

表1 不同粘细菌在主要生境中的分布^[13]

生 境	普 遍	多 见	常 见	少 见
土壤	<i>Na. exedens</i>	<i>So. cellulorum</i> <i>Ar. serpens</i> <i>Cc. coralloides</i>	<i>Polyangium</i> spp. <i>Cystobacter</i> spp. <i>Melittangium</i> spp.	<i>Mx. fulvus</i> <i>Mx. virescens</i> <i>Mx. stipitatus</i>
草食性	<i>Mx. fulvus</i>	<i>Mx. virescens</i>	<i>Na. exedens</i>	<i>Sg. erecta</i>
动物粪粒	<i>Cc. coralloides</i>	<i>Cb. fuscus</i> <i>Cb. ferrugineus</i> <i>Ar. serpens</i>	<i>Cb. violaceus</i> <i>Polyangium</i> spp.	<i>Mx. xanthus</i> <i>Melittangium</i> spp.
树皮或腐木		<i>Sg. aurantiaca</i> <i>Cm. apiculatus</i> <i>So. cellulorum</i> <i>Cc. coralloides</i>	<i>Mx. fulvus</i>	<i>Cm. pediculatus</i> <i>Haploangium</i> spp.

粘细菌属名缩写:

An. 囊球菌属 (*Angiococcus*); Ar. 原囊菌属 (*Archangium*); Cb. 孢囊杆菌属 (*Cystobacter*); Cc. 珊瑚球菌属 (*Corallococcus*); Cm. 软骨霉状菌属 (*Chondromyces*); Ha. 单囊菌属 (*Haploangium*); Me. 蜂窠囊菌属 (*Melittangium*); Mx. 粘球菌属 (*Myxococcus*); Na. 小囊菌属 (*Nannocystis*); Pl. 多囊菌属 (*Polyangium*); Sg. 标柱菌属 (*Stigmatella*); So. 堆囊菌属 (*Sorangium*)

度等也有粘细菌的分离。一般来说,粘细菌在中性或微碱性的土壤中更易分离,而温暖干燥地区的土壤粘细菌更为丰富。

2 分离培养

粘细菌是土壤中的常见菌,通常一小勺的土样可以分离出四、五种粘细菌。然而粘细菌的以下特性使我们常用的细菌学培养基和稀释平板分离方法失效:(1)胞外粘液使粘细菌细胞在水中不易分散,而且许多粘细菌单细胞不易萌发生成菌落^[13];(2)在贫瘠的培养基上,粘细菌通常形成特征性的薄而扩展的菌落,易于污染;在营养丰富的培养基上不生长,或形成致密的不扩展小菌落,不能与其它细菌区分;(3)生长速率缓慢,容易被其它生长迅速的菌,尤其是霉菌所掩盖,或被易运动的阿米巴、蠕虫等污染。

粘细菌特殊的分离纯化方法是建立在菌体细胞在一定条件下,可聚集形成子实体和在贫瘠的培养基上的粘细菌菌落易于扩展的基础上。

分离粘细菌的土样应是富含其它微生物群落的;非常新鲜或陈旧的粪粒不利于粘细菌的分离;而已经软腐的木头和树基部树皮或已伐倒的树木对分离粘细菌非常有利。样品采集后若不立即分离,应迅速风干,以减少霉菌的污染及其对粘细菌的伤害。经验表明,风

干的土样在室温下放置十几年后仍可分离相同的粘细菌(Reichenbach,私人通讯)。这可能反映了在自然介质中粘细菌子实体(孢子)比在滤纸上干燥的子实体(孢子)更加稳定^[12]。粘细菌可以通过子实体或扩展菌落的边缘分离。

2.1 诱导子实体的形成 采集的土样盛在大培养皿内,加入含霉菌抑制剂放线菌酮(Cycloheximide)的蒸馏水浸湿,在土样的表面半埋入数个灭菌的野兔或未受抗生素或尿液污染的家兔粪粒作为诱饵,室温(20℃)或30℃保温培养,2d后每天观察粪粒上子实体的形成。土壤中的粘细菌藉滑动运动到粪粒上生长,并形成子实体,子实体的大小从50μm到1000μm不等,常为各种鲜艳的亮色,一般肉眼可见,也可借助放大镜或解剖镜观察。由于某些粘细菌子实体形成后会迅速崩溃,或被其它杂菌掩盖而变得不明显或不易挑取,因此必须每天观察,并尽可能早地挑出子实体,减少污染。

树皮、腐木或粪粒置于垫有二或三层滤纸的大培养皿内,样品先用含放线菌酮的蒸馏水浸泡数小时以抑止霉菌的生长,再以适宜的湿度在室温或30℃保温14~20d。在3d后每天观察子实体的形成(可能出现在样品上或滤纸上)。大多数的粘细菌子实体将在10d内形成,少数可能需要近20d。

经验表明,采用粪粒诱导子实体形成的方法分离

到的粘球菌(*Myxococcus* spp.)的比例更高。由于兔粪粒的采集和使用不方便,目前该方法在国外已较少使用,更多使用的是活菌线法和滤纸片法。

2.2 从扩展的菌落边缘分离 在水琼脂平板上,嗜细菌粘细菌自行滑动到有菌的地方生长,有些菌还可以形成扩展的菌落。如在 1.5% 的水琼脂平板上,用活菌如 *E. coli*, 酵母等在平板上划厚密的交叉线、平行线或圈,接种样品后 30℃ 保温,仔细观察粘细菌的扩展菌落和子实体的形成。大多数粘细菌将在 8 至 14d 内出现菌落。粘细菌首先在活菌线上生长,其后在食物菌线之间的琼脂平板上扩展形成菌落。在交叉划线的分离平板上,不同的粘细菌可能各占一条食物菌线扩展,也可能在同一条菌线上依次扩展。一般的扩展次序是孢囊杆菌(*Cystobacterineae*),然后是堆囊菌(*Sorangineae*)。对于仅在食物菌线上生长的粘细菌,为避免因携带食物菌而造成后期纯化的不便,也可采用 *E. coli* 灭活后划线的方法。本方法自 Singh^[14] 发明以来,虽有小的改动,仍是目前分离溶细菌粘细菌群的最有效的方法。值得指出的是,由于不同的粘细菌形成的菌落差异不明显,且无显著特征性,需要有一定的经验积累。

2.3 纤维素堆囊菌(*So. cellulorum*)的分离 分离降解纤维素的粘细菌目前尚无很好的方法。一般采用在仅含无机盐的水琼脂(ST21)^[13] 平板上覆盖一张滤纸,撒接一小勺土样或植物碎片,保温培养。粘细菌将在 10~20d 间长出。菌落为半透明的亮色斑,可能包含各种初始腐生菌和后继生长的次生菌。在进一步的富集纯化时,应分别接种筛选溶细菌群和溶纤维素群的培养基,因为非纤维素降解粘细菌也可能利用纤维素降解菌的分解产物而次生长。因此滤纸平板也可用作非纤维素降解粘细菌的分离平板。富集培养时,为便于观察菌的初始生长,可采用纤维素粉或可溶性纤维素平板,但费用相应提高。

3 纯化

经分离富集的粘细菌由于粘液的蔽护,其它杂菌的迅速生长或蠕虫等的活动,仍会存在各种污染,进一步的纯化将是最为耗时耗力的。一般在熟练操作条件下,纯化一株溶细菌群的粘细菌需 1~2 月,而一株纤维素堆囊菌的纯化则可能历时 1~2 年。最简单的纯化

过程是从未受污染的子实体中的粘孢子直接纯化接种到 CY 或 VY / 2 平板上(选择不同培养基对后期研究有些影响,如接种 CY 平板的粘细菌很快失去形成子实体的能力)。为避免杂菌的污染,应尽可能早地接出粘孢子。此外,采用拉细的玻璃棒在子实体上轻点一下效果更好。该方法对于实体松软的粘细菌较为适宜,如粘球菌(*Myxococcus* spp.);而标桩菌(*Stigmatella* spp.)和软骨霉状菌(*Chondromyces* spp.)因子实体具柄,可与平板基面的杂菌分开也易于分离;其它的粘细菌因子实体壁坚硬或与基质紧密交织,加上粘液的作用而不易一步纯化。

不能直接纯化的粘细菌需进行再次富集。将分离菌转入活或死的 *E. coli* 划线的水琼脂平板上培养,从扩展的菌落边缘取菌,接种 CY 或 VY / 2 平板。如分离菌在活的 *E. coli* 菌线上不能生长,则应考虑是纤维素堆囊菌(*So. cellulorum*)。

由于许多生物都可以利用 *E. coli* 生长,粘细菌缓慢的生长速率和粘液对杂菌的携带等,仍会有其它生物存在,此时可采用一些特殊的方法处理:

(1) 霉菌和酵母 可通过添加放线菌酮除去,对于耐药真菌,用制菌霉素(nystatin)粉撒在欲分离物上则可以完全除去^[13]。

(2) 小型土壤动物,如蠕虫等 在 -80℃ 放置 1~2d,解冻后立即(避免培养基软化造成污染)转接,即可除去蠕虫等^[15]。

(3) 变形虫 用 5% 氨水熏蒸待分离的培养皿 1~2min 后,盖上皿盖保持 2~5min,立即转接分离物到 CY 或 VY / 2 培养基上,以免少数休眠态变形虫存活而污染^[13]。

(2) 和 (3) 两种处理方法应使用粘细菌的子实体或粘孢子,以免被低温或高碱性培养基杀死。

(4) 细菌 细菌是污染物中最难以除去的,尤其是与粘细菌性质相似的革兰氏阴性杆菌。从粘细菌形成的扩展菌落边缘接种,可除去大部分细胞较大、不运动的细菌,如芽孢杆菌(*Bacillus*)及其孢子。许多细胞较小、可运动的革兰氏阴性菌需选择特殊的方法除去。稀释平板法对部分纯化后期的粘细菌是有效的,但大多数粘细菌,尤其是堆囊菌亚目的菌由于在水中分散困难和难以从单细胞萌发形成菌落而不能采用。二是热处理法。研究表明大多数粘细菌孢子可耐 58℃ 温

度,以此温度处理10min足以杀死许多细菌、霉菌和变形虫^[13];三是抗生素处理。由于粘细菌孢子在营养丰富的培养基中不易萌发生长^[13],而其它许多细菌萌发生长良好。利用此性质,将分离物加入含多种抗生素的营养丰富培养液中摇床过夜,如培养液澄清,则表明萌发的杂菌被杀死;如培养液浑浊,表明萌发的杂菌耐药生长,这时可换一组抗生素重新处理。

通常降解纤维素的粘细菌生长非常缓慢,并且滤纸平板由于水浸而极易污染,初期的生长由于滤纸片的干扰不易观察到,因而分离纯化既困难又耗时。纤维素堆囊菌的纯化一般包括如下几个步骤:从初筛皿取子实体再转接滤纸平板以确认纤维素分解性质。每皿可放3~4张较小的滤纸片,从初筛平板上取不同处菌接种;同上述方法除去霉菌、酵母、蠕虫、阿米巴等;由于大多数纤维素堆囊菌在灭活的 *E. coli* 划线平板上生长良好,可形成大而精致的菌落,同时加入卡那霉素可抑止部分细菌的生长而对分离菌无作用,从菌落边缘挑接 VY/2 平板即可除去细菌;最后用滤纸平板证明所分离的菌仍为纤维素降解菌。也可以用热处理或抗生素处理(同上述)纯化纤维素堆囊菌。当分离菌较为纯净时,可接种几丁质或纤维素粉平板,粘细菌可在几丁质平板上迅速生长形成大而薄的菌落,纤维素平板上生长有些延迟,但仍可形成扩展菌落。最近我们采用纤维寡糖作碳源纯化纤维素堆囊菌获得成功(*J. Microbial. Meth.* 1996, 25(1): 43~47),纯化的有效性加强,时间缩短。

是否获得了纯化的粘细菌可通过如下几方面检测:(1)在营养丰富的培养基上粘细菌不生长或生长弱;(2)以CY等培养基上菌落的形态鉴别;(3)镜检菌体细胞的大小、形态及运动性。简单的方法是接种 Myx 平板和1%蛋白胨液,如镜检平板无杂菌,并且液体摇

瓶不浑浊即可认为已纯化。此外值得注意的是:粘细菌纯化培养后的传代培养过程中很快会失去形成子实体的能力,而且不同培养基上子实体形态也会改变。

我们采用本文所述方法在半年内从全国十多个省市的土样分离并且纯化了包括8个属的近50株粘细菌,证明了方法的可行性。

参 考 文 献

- [1] Dworkin M, Kaiser D. *Science*, 1985, 230: 18~24.
- [2] Shimkets L J. *Microbiol Rev*, 1990, 54: 473~501.
- [3] Reichenbach H, Hofle G. in *Bioactive metabolites from microorganisms*, M. E. Bushell and Grafe (ed.), Elsevier Sci. Pub., Amsterdam, 1989, 79~100.
- [4] Reichenbach H, Gerth H, Irschik B, et al.: *Trends Biotechnol.*, 1988, 6(6): 115~216.
- [5] Sutherland I W. *J Gen Microbiol*, 1979, 111: 211~216.
- [6] Mayer H, Reichenbach H. *J Bacteriol*, 1978, 136: 708~713.
- [7] Dhundale A, Lampson B, Furuich T, et al. *Cell*, 1987, 51: 1105~1112.
- [8] Inouye S, Herzer P J, Inouye M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 942~945.
- [9] Rosenberg E(ed). *Myxobacteria. Development and cell interaction*, Springer-Verlag, NY, 1984.
- [10] Dworkin M and Kaiser D(ed). *Myxobacteria II*, Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C., 1993
- [11] Reichenbach H. *Biology of Myxobacteria: Ecology and Taxonomy*, in *Myxobacteria II*, Dworkin M and Kaiser D (ed), Am Soc Microbiol Washington DC, 1993, 13~62.
- [12] Peterson J E. in *Microbiology*, Norris J R and Ribbons D W(ed) Academic Press, NY, 1969, Vol3B, 185~210.
- [13] Reichenbach H, Dworkin M. in *The Prokaryotes*, 3416~3487.
- [14] Singh B N. *J Gen Microbiol*, 1947, 1: 1~10.
- [15] Reichenbach H. *J Microbiol Meth*, 1983, 1: 77~79.