

我国粘细菌(*Myxobacteria*)资源的分离与鉴定*

李越中 李 健 周 璐 张 勇 胡 玮

(山东大学生命学院微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

陈 琦

(山东省农业科学院实验中心 济南 250100)

关键词 粘细菌, 分离, 鉴定

中图分类号: Q939.15 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)06-0652-56

粘细菌是原核生物中一类具有复杂多细胞行为的革蓝氏阴性细菌^[1],能够在细胞间通过信号的传递和感应,协同摄食、运动和发育形成子实体,具有显著的社会学特征,被认为是高等的原核生物^[2,3]。另一方面,粘细菌能够产生丰富的次级代谢产物^[4]。粘细菌产生抑菌活性的阳性菌率甚至高于著名的次级代谢物产生菌放线菌,是具有极大研究开发价值的微生物类群。

长期以来,粘细菌的研究受限于菌株的纯化和培养。国际上保存粘细菌菌株数量最全的单位是德国的国家生物技术研究中心(GBF),而在美国 ATCC 菌库的粘细菌也仅有少量的几株保存。在我国的几个大的菌库中,粘细菌的收集几乎等于零。本文报道从我国二十多个省市采集的样品中,分离了大量的粘细菌菌株,经过几年的纯化,获得了几百个粘细菌的纯菌株。分类鉴定表明,这些菌株分属于粘细菌十二个属中的十个属。

1 材料和方法

1.1 土样的采集

分离粘细菌的样品从中国境内十几个省市的一百多个样点采集,主要土样,此外还包括有朽木、食草性动物的粪便等。样品采集后,自然风干。风干的样品在室温条件下存放待分离。

1.2 粘细菌的分离纯化

1.2.1 粘细菌的分离:分离嗜细菌群粘细菌用水琼脂平板,以活的大肠杆菌细胞作为粘细菌底物。分离嗜纤维素群粘细菌用培养基为 KNO_3 1.0g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0g, $\text{gSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.0g, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{HO}$ 0.2g, 琼脂 15g, 定容至 1L。平板上铺放灭菌滤纸作唯一碳源。为减少霉菌的污染,在培养基中添加 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 的过滤除菌的放线菌酮^[5]。

制备好的平板撒上风干的样品, 30°C 保湿培养直至 20d 左右。培养过程中及时分离挑取粘细菌的子实体结构,转接涂沫了死大肠杆菌的水琼脂平板。获得的菌株检验纯度。

1.2.2 加热法纯化粘细菌:粘细菌的子实体悬浮于 1mL 无菌水中, 58°C 水浴 30min, 3000r/min 离心,沉淀物转移到 VY/2 鲜酵母 5.0g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0g, VB_{12} 0.5mg, 琼脂 15g, 定容至 1L, pH7.2 培养基上, 30°C 培养,通常 1~2d 后出现粘细菌菌落,及早从边沿挑取。

*国家自然科学基金(39570013),海洋 863 青年基金(819-Q-03)和山东省优秀中青年科学家奖励基金(97175508)资助项目

作者简介:李越中(1964—),男,山东大学微生物技术国家重点实验室副教授,博士,主要从事原核生物的分化发育和次级代谢研究

收稿日期:1999-12-06,修回日期:2000-04-17 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1.2.3 抗生素法纯化粘细菌 粘细菌子实体悬浮于 1mL 的 1% 蛋白胨培养液(粘细菌的粘孢子在此条件下不能萌发生长^[5])中,加 0.1mL 多种抗生素混合液,30℃ 摇床过夜。若第二天溶液变混浊,表明杂菌耐药生长,则离心后换用另一组抗生素溶液重复上面的步骤,直至澄清,3000r/min 离心,水洗离心除去残药,将菌体沉淀物转移到 VY1/2 培养基上,30℃ 培养,出现粘细菌菌落后及早从边沿挑取。

1.2.4 粘细菌纯度的检验 纯化的粘细菌的纯度检验用 VY/2 平板培养观察是否有混染菌落,或 LB 液体培养过夜,观察培养液是否浑浊(粘细菌在 LB 中不能生长)。

1.3 粘细菌的保存

粘细菌的长期保存采用了实体结构,风干后室温干燥保存。

1.4 粘细菌的分类鉴定

1.4.1 粘细菌生理类群的鉴定 采用基本盐-滤纸平板和水琼脂-*E. coil* 活菌平板同时对每株菌培养鉴定。

1.4.2 粘细菌的分类鉴定 根据《Bergey's manual of systematic bacteriology》第九版^[6]和《Prokaryotes》第二版^[5]的粘细菌分类标准,以菌株的营养细胞、粘孢子、子实体结构、生长的菌落形态等确定纯化菌株的归属。

2 结果和分析

2.1 粘细菌的分离纯化

在我们分析的绝大多数样品中均发现粘细菌的子实体结构,但在种类和数量上有显著差异。一般来说,粘细菌的分布主要与土壤的性质有关,如富含有机质的土壤样品中粘细菌的数量较多。平均每个黑土或农田土样品可以分离约 5 个不同子实体形态的嗜细菌群粘细菌菌株,2~3 个嗜纤维素群的粘细菌菌株。而沙土或黄土样品分离的样品粘细菌的数目较少,平均每个样品只发现 1~2 个粘细菌。文献报道,不同地区、不同样品来源和不同生境中的粘细菌分布是不均匀的^[5]。仅从粘细菌菌株分离的数量上看,我国东北的黑土、济南的粘土和福建的农田土差异不大,均可获得大量的粘细菌菌株,但种属的区别较大。同一地区的不同样点的粘细菌菌株数可以有很大差异,但种属数量没有太大差异,如北京的农田土、沙土、庭院土等。

2.2 粘细菌的分类鉴定及种属的菌株数量

粘细菌已经确定的分类类群包括 12 个属约 40 个种。除单囊菌属(*Haploangium*)包括 2 个种)尚未能人工培养外,其余的 11 个属均获得了人工纯培养^[7]。表 1 列出了我们获得的粘细菌纯培养种属的菌株数目。出现频率最高的粘细菌属是粘球菌(*Myxococcus*)并且粘球菌的纯化也最为容易。堆囊菌

表 1 分离鉴定的粘细菌名称和数量

Names of myxobacteria	Numbers	Names of myxobacteria	Numbers
<i>Angiococcus</i> spp.	13	<i>Mx. fulvus</i>	20
<i>Archangium</i> spp.	11	<i>Mx. xanthus</i>	32
<i>Corallococcus</i> spp.	15	<i>Nannocystis</i> spp.	28
<i>Cc. coralloides</i>	17	<i>Polyangium</i> spp.	14
<i>Cysterbacter</i> spp.	14	<i>Sorangium</i> spp.	101
<i>Cb. ferrugineus</i>	15	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	5
<i>Cb. fuscus</i>	11	<i>Sg. erecta</i>	15
<i>Melittangium</i> spp.	4	<i>Undetermined myxobacteria</i>	150
<i>Myxococcus</i> spp.	17	Total number	482

(*Sorangium*) 珊瑚球菌(*Coralloccoccus*) 孢囊杆菌(*Cystobacter*) 等也较容易分离,但蜂窝囊菌(*Melittangium*) 非常少见,仅发现了 4 株,未发现软骨霉状菌(*Chondromyces*) 和单囊菌。

2.3 纯化粘细菌各菌属特征

粘细菌对底物的利用能力上可以分为 2 类,一类是不能利用纤维素,但可以降解利用活细菌的(嗜细菌类群, Bacteriolytic group),另一类不能降解利用活细菌(但可以分解利用死菌),却能分解利用纤维素的(嗜纤维素类群, Cellulolytic group)。前者包括了粘细菌的 11 个属的全部种,后者只有一个属,即堆囊菌属(*Sorangium*)。细菌降解类群粘细菌的子实体差异极其显著。值得一提的是,如果没有纯化,可能出现既能降解活细菌又能降解纤维素的分离菌,但进一步的纯化将获得单一降解能力的菌。表 2 列出了纯化鉴定的粘细菌各个属主要的区别特征。

表 2 分离的粘细菌各属菌株的主要特征

属名	子实体	营养细胞	粘孢子	菌落
<i>Angiococcus</i>	球形,成丛,直径 30 ~ 50 μm ,有明确外壁,黄色、深棕色	细长,末端尖,长 3 ~ 8 μm	近乎球形,表面光滑,直径 1.2~2 μm	菌落表面结构不发达,有蔓延辐射线
<i>Mycococcus</i>	球形隆起,软,直径 50 ~ 400 μm ,单生,浅黄色、黄色、橙色、红色、棕色	细长,末端尖,长 2 ~ 10 μm	球形、卵球形,2 种直径,1.2 ~ 1.8 μm ,或 1.8~2.5 μm	薄膜状扩展,有明显辐射状波纹,有些菌分泌水溶性黄色物质
<i>Coralloccoccus</i>	不规则,坚硬峭状,可见珊瑚状分支,植于琼脂中,黄色、橘红色、棕色	细长,末端尖,长 3.5~7 μm	球形,直径 1.0 ~ 2.5 μm	薄膜状扩展,显示明显的辐射线。菌落边缘通常有火焰状突出
<i>Archangium</i>	不规则,脑状或肠状,常有指状突起,颜色随发育加深	细长,末端尖,长 4 ~ 12 μm	豆形或几乎球形,直径 ~ 2 μm	薄而扩展,表观通常密实,具有长的辐射状线
<i>Cystobacter</i>	成堆,生于基质上,大型,卵球或长形,褐色,亮橙色	细棒状,末端尖,长 4~15 μm	粗杆,1.1~1.8 \times 1.8 ~ 4 μm	薄膜状扩展,有明显辐射线,边缘有精美的边
<i>Melittangium</i>	孢子囊圆形,直径 25 ~ 35 μm ,单生柄上,柄纤细	细棒状,末端尖,长 3.5~7 μm	短棒状,长 1.5 ~ 2.5 μm	薄膜状扩展,常常显示明显的辐射线
<i>Stigmatella</i>	发育由肉色变橙色到深棕色,孢子囊单生或聚生于柄上	细棒状,末端尖,长 5~10 μm	短杆 2~3 μm 长	薄膜状扩展,有明显的辐射状,边缘通常有精美的边
<i>Polyangium</i>	近球形,15~30 μm 或 100 ~ 400 μm ,堆生或单生,黄色、橙色、浅棕色、深褐色	短杆,末端钝圆,长 2.5~7 μm	形态上与营养细胞区别小,2~5 μm 长	琼脂凹陷,有辐射线,膜状扩展,有些菌株有水溶性黄色分泌物
<i>Sorangium</i>	大量堆积,20~200 μm ,黄色、橙色、棕色、铁锈色、黑色	短杆,末端钝圆,长 2.5~10 μm	形态上与营养细胞区别小,长 1~3 μm	或多或少蚀刻琼脂,扩展菌膜辐射状或扇状
<i>Nannocystis</i>	小,单生,卵球形,直径 10~30 μm ,大量形成,埋在基质中	短杆状,末端钝圆,长 2.5~5 μm	球形或卵球形,直径 0.8~1.2 μm	或多或少蚀刻琼脂,有不显著环状峭,细胞边缘积聚成大的边峭

2.4 嗜纤维素群粘细菌的多样性

在目前的分类系统中,所有的能够降解纤维素的粘细菌均归入堆囊菌属(*Sorangium*)。被确认的种

只有纤维堆囊菌(*So. cellulosum*)。从分离的 100 多株降解纤维素的粘细菌菌株看,菌株形态差异较大。主要表现在几个方面:子实体颜色可分为黄色、橙色、褐色和黑色四个类群;子实体大小有小型(10~20 μm)和大型(30~60 μm)两种,营养细胞大小也分为 3~5 μm 和 4~7 μm 两种。此外,子实体的形成能力、形成区域和纤维素降解能力等也有差异。因此,有关该类群粘细菌的分类研究还只有一个雏形,进一步的研究对纤维堆囊菌资源的利用有重要意义。

2.5 粘细菌菌株的保存

粘细菌的保存可以采用多种方式。平常使用菌株可以采用斜面或平板培养物保存,根据我们的操作,一般 2~3 个月内需要转接一次。长期的保存可以采用风干的子实体室温保存方法,4 年前我们保存的菌株依然能够存活。此外,也可以使用 -65 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱或液氮罐长期保存粘细菌。

3 讨论

粘细菌是土壤中的常见菌,通常一小撮的土样可以分离出四、五种粘细菌。由于粘细菌的单个细胞不能形成菌落,细胞代时很长,细胞壁上有复杂的胞外附属物,易于携带其它细菌、真菌、阿米巴、甚至线虫卵,给粘细菌的分离和纯化带来困难。因此,粘细菌的分离纯化与普通细菌不同。目前的纯化过程不具有针对性,不能通过 1、2 次操作达到目的。一般,粘细菌的分离纯化需要几个月的时间,某些类群如嗜纤维素粘细菌耗时更长,常常需要 1~2 年的时间。这些困难阻碍了粘细菌的研究,这也是粘细菌研究工作较少的原因。其它如采取纤维寡糖的方法^[8],可以在一定程度上,对某些类群的粘细菌的分离有效,但该方法也会带来其它的问题,如因为不是以子实体为第一步分离富集的手段,使得另一大类的滑动细菌——嗜纤维目(Cytophagales)细菌同时被富集的机会加大,而该类群具有更为丰富的胞外分泌物,在进一步的纯化中同样难于除去。从粘细菌的特点看,为使得粘细菌的研究更加普及,有必要分析粘细菌单个细胞不能萌发形成菌落的原因,另一方面,解决粘细菌胞外分泌物的问题,也会为粘细菌的纯化带来便利。

粘细菌形成子实体的时间一般较长,大多数是在 10 天内形成,少数也可能需要近 20 天的时间。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,因而须每天观察,待子实体出现后立即转接。

粘细菌的子实体结构、细胞的运动、摄食行为、细胞的结构等表明,粘细菌是一个具有很强同源性的类群^[5,6]。与一般细菌分类方式显著不同的是,粘细菌的分类主要以形态特征为依据的,包括营养细胞的形态、粘孢子的形态,子实体的形态和在某些培养基如 VY/2 上生长的菌落形态。1992 年 Shimkets 对 12 株粘细菌^[7]和 1999 年 Sporer 对 54 株粘细菌^[9]的 16s rDNA 同源性普查分析结果不但完全验证了粘细菌的同源性,并基本肯定了已有的粘细菌的分类方式。

参 考 文 献

- [1] Dworkin M. *Microbiol Revs*, 1996, 60(1): 70~102.
- [2] Kaiser D, Kroos L. Intercellular signaling. In: Dworkin M, Kaiser D, ed. *Myxobacteria II*. Washington DC: Am Soc Microbiol, 1993. 257~283.
- [3] 周璐, 李越中, 李健. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(6): 544~547.
- [4] Reichenbach H, Hofle G. Production of bioactive secondary metabolites. In: Dworkin M, Kaiser D, ed. *Myxobacteria II*, Washington DC: Am Soc Microbiol, 1993. 347~397.
- [5] Reichenbach H, Dworkin M. The Myxobacteria. In: Balous A, et al. *The Prokaryote*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1992. 3418~3487.
- [6] McMurdy H D. Order Myxococcales. In: Staley J T, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. 2139~2170. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [7] Shimkets L ,Woese R. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1992 **89** :9459-9463.
 [8] Li X-Z ,Liu J ,Gao P-J. *J Microb Method* ,1996 **25** :43-47.
 [9] Sproer C ,Reichenbach H ,Stackebrandt E. *Int J Syst Bacteriol* ,1999 **49** :1255-1262.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MYXOBACTERIA

Li Yuezhong Li Jian Zhou Lu Zhang Yong Hu Wei

(State Key Laboratory of Microbial Technology ,College of Life Science ,Shandong University ,Jinan 250100)

Chen Qi

(Experiment Center ,Shandong Academia of Agriculture Science Jinan 250100)

Abstract : This paper reported that the authors isolated large numbers of myxobacteria from more than 100 samples collected in many places of China. More than 400 pure strains were obtained. These strains belonged to 10 genera of Myxococcales. The most frequent genera isolated were *Myxococcus* , *Sorangium* , *Coralloccoccus* and *Cystobacter* . *Melittangium* was seldom isolated. No *Chondromyces* and *Haploangium* were found.

Key words : Myxobacteria ,Isolation ,Identification

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(39570013) ,Ocean 863 Youth Fund (819 - Q - 03) ,and Shandong Encouraging Fund for Excellent Scientist(97175508)

欢迎订阅《中国酿造》杂志邮发代号 2—124

《中国酿造》立足于传统酿造与开拓新酿造技术相结合。杂志专业性强 ,论述精辟 ,深入浅出 ,影响力大。主要栏目有 :专论与综述、研究报告、新产品·新工艺、交流篇、酿造知识等。以刊登酱油、醋、酱类、酱腌菜、酒类、发酵豆制品以及酶制剂等方面的内容为主。内容丰富、信息量大 ,可操作性强 ,是从事酿造事业的科技人员、大专院校的师生以及酿造企业职工必不可少的专业刊物。

《中国酿造》杂志创刊于 1982 年 2 月 ,由原来的国内发行改为国内外公开发行 ,已被美国《化学文摘》列为酿造专业摘录刊物。(自 1982 年至 1999 年被收录文章 236 篇)。由于她不断前进 ,已成为我国具有权威性的酿造专业技术刊物。并被确定为《轻工业·手工业类核心期刊》,编入 2000 年版《中文核心期刊要目总览》。

《中国酿造》为适应我国信息化建设需要 ,扩大作者学术交流渠道 ,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和中国期刊网。

《中国酿造》杂志为双月刊 ,逢双月 20 日出版 ,大 16 开本 ,56 页 ,单价 8.00 元 ,全年 6 期定价 48.00 元。全国各地邮局均可订阅 ,也可以将款直接汇本社订阅 ,定价不变(免邮寄费)。

国际标准刊号 :ISSN 0254—5071

国内统一刊号 :CN11—1818/TS

汇款请寄 北京市宣武区槐柏树后街 24 号 301 室《中国酿造》杂志社收

邮编 :100053

电话 (010) 63152926