

由土壤分離抗生素鏈絲菌的方法

楊明久

(瀋陽中國醫科大學微生物教研室)

鏈絲菌在產生抗生素物質的微生物中佔很重要地位。鏈黴素、金黴素、氯黴素、土黴素等重要抗生物質都是由一些不同的鏈絲菌所產生的。

目前我們國家進行大規模經濟建設，仍然在付出很多的代價來買入大批的抗生素供給醫療保健需要。因此我們應當加強抗生素方面的生產和研究，以期能大量自製品質優良的產品。其中重要工作之一，是找出更有優良抗生性能的微生物種。在我國廣大國土一定蘊藏着許多有價值的抗生微生物，我們應當找出供給生產需要。

為了有效的進行這一項工作，一方面由組織領導來着手，使全國分散在各地的微生物工作者都參加到這一工作中來；另一方面在技術上選用既簡便而又有效的分離方法和培養基，也是分離出有價值抗生菌種的重要前提。

在土壤中的微生物種類多且複雜。按文獻記載，由土壤中分離非致病性鏈絲菌所使用的特殊培養基如：Conn 氏甘油天門冬素培養基，以及用土壤浸液加磷酸鉀和葡萄糖的瓊膠培養基等^[1]。至於由土壤分離有抗生作用的微生物時所使用的培養基種類很多，方法也繁簡不一^[2]。現在很多人仍沿用由 Gratia 和 Dath 兩氏最初所報告的，並且為 Waksman 氏等在 1944 年分離灰色鏈絲菌 (*Streptomyces griseus*) 時所用的所謂細菌瓊膠平板法^[3,4]。

作者曾使用單純的土壤浸出液做瓊膠培養基，作為由土壤樣品直接分離鏈絲菌的培養基，經過培養數日後，再加上極薄一層混有細菌的普通瓊膠，然後培養觀察。這樣既達到分離鏈絲菌而又可達到初步檢出其抗生作用的目的。

方 法

一. 培養基製作

燒瓶內裝入校庭花園或田野土壤(有機物質腐蝕質過多者效果不好，易生長其他種類土壤微生物) 500 克，加入普通水 1 升，用蒸氣滅菌 100°C 1—2 小時。然後把其

中的土壤浸出液倒出用濾紙濾過，按百分之二比例加入瓊膠做成土壤浸液瓊膠。

二. 培養

將採集的土壤標本用普通水稀釋 2—5 倍，做成土懸液。用玻璃棒攪拌，或振盪待土壤顆粒大部沈落到容器底部時，用白金耳沾取懸液上清，直接在土壤浸液瓊膠上做劃線培養。放在 28—37°C 孵箱內，2—3 天後在培養基表面沿劃線長出多數孤立鏈絲菌集落。同時並無其他種微生物(細菌或真菌)生長。

三. 重層細菌瓊膠

普通瓊膠培養基加溫溶解後，在恒溫水浴箱內保持 50°C，並將預先培養在普通肉湯內 8—10 小時的大腸桿菌(或其他種類微生物亦可)加入適當量，混合後，取其中 2—3 毫升注入上述生長有鏈絲菌集落的土壤浸液瓊膠表面上，在凝結前迅速傾斜旋轉，使細菌瓊膠均等地附着在土壤浸液瓊膠表面上，並將剩餘的細菌瓊膠倒棄。於是在培養基表面上形成了含有大腸桿菌的極薄普通瓊膠一層(厚約 0.5 毫米左右)，再放於 37°C 孵箱內培養。

四. 抗菌菌種選擇

上項培養在 18 小時後觀察結果，即可看到有多處鏈絲菌集落周圍呈出圓形無大腸桿菌發育的透明帶，並在它周圍形成的透明帶直徑有大有小，但一般集落周圍透明環超過一定程度就可選出，用做進一步的抗菌譜分析試驗。

討 論

細菌瓊膠平板法雖然比較廣泛地應用來由土壤中分離抗生性鏈絲菌。但據蘇聯學者 Г. Ф. Гаузе 氏的意見^[4]，認為該法有一定缺點，即凡是抗生機制主要是由於溶菌作用的菌種，可用此法分離出來。但像產生金黴素的菌種不能利用培養基內細菌菌體做氮源，同時它的抗生機制是抑制細菌的生長，就不能利用這種方法發現。Гаузе 氏並根據自己的實驗證明，含有無機鹽類和葡萄糖的培養基(pH 7.5)也不合適，因為有些抗生性鏈絲菌在培養基上不出現抗生作用。

另一方面，很多抗生素的形成需要在鏈絲菌生長的基質上利用蛋白質做氮源，但除去像細菌瓊膠平板法以細菌代替基質內氮源的方法外，若培養基內含有一般蛋白質或多肽類，並用它直接由土壤分離鏈絲菌時，又常被種類繁多的土壤微生物所污染，因而得不到好的結果。

作者使用土壤浸液瓊膠培養基做直接由土壤分離鏈絲菌時，在它的上面其他種

土壤微生物(細菌、真菌)都較難生長,唯有鏈絲菌生長的很好,因此本培養基可以做爲鏈絲菌的優良選擇培養基之一。假如用標本的同一場所的土壤做浸液時,製成的培養基又恰好適合標本內鏈絲菌生長上的自然要求。同時土壤的性質及浸液的氫離子濃度等問題都可不必考慮。又鑑於在適合於被實驗菌種(大腸桿菌或其他種微生物)的發育條件下,很多鏈絲菌不出現抗生作用,因而當鏈絲菌在土壤浸液瓊膠上長好後,再用細菌普通瓊膠重層較合適。同時也可以不產生像細菌瓊膠平板法的缺點。

用這種培養分離方法是否能把在土壤內所有抗生素鏈絲菌都選出來?作者僅用本法作過初步短時間的分離工作,並分離出一些抗生素鏈絲菌菌種,感到在第一步分離時很方便也很經濟。而且僅有最基本設備的實驗室都可以做鏈絲菌的大量分離工作;但究竟在實際應用上怎樣,還需進一步研究和在實際應用上逐漸改進。

結 論

1. 用單純土壤浸出液瓊膠做土壤內鏈絲菌直接選擇分離培養基,效果很好。
2. 土壤內鏈絲菌在土壤浸液瓊膠上生長成集落後,在瓊膠表面上加上一層極薄的細菌普通瓊膠,再培養並觀察鏈絲菌集落周圍有無透明環形成,用以選擇抗生素鏈絲菌菌種。

本文蒙景冠華副教授校閱,謹致謝意。

參 考 文 獻

- [1] Henrici, A.T. Molds, yeasts and Actinomycetes. Second edition. By Skinner, C.E., Emmons, C.W. and Tsuchiyu, H. John Wiley & Sons, Inc, N.Y., 59, 1948.
- [2] 載自英:實用抗生素學。8-13, 1952。
- [3] Waksman, S.A. Microbiol. antagonisms and antibiotic substances. Commonwealth. Fund. New York, 57, 1945.
- [4] Гаузе Г. Ф. Лекции по Антибиотикам. Издательство Академии Медицинских Наук СССР. 180-183, 1953.

METHOD OF ISOLATING OF ANTIBIOTIC STREPTOMYCES FROM SOIL

YANG, M. C.

Chinese Medical College, Shenyang

1. By using simple soil extract as agar medium, good result has been obtained in isolating streptomyces from soil directly.
2. When colonies of streptomyces have been formed on the soil extract agar medium, a very thin ply of agar seeded with a test microorganism over the surface of the culture, and continue the cultivation for 18 hours more. A translucent zone surrounding the colonies indicates antibiotic activity of the streptomyces. such Streptomyces were selected for further experiment.