

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(8):1094-1097; 4 August 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 超声波处理土样分离放线菌

姜怡<sup>1</sup>, 曹艳茹<sup>1,2</sup>, 赵立兴<sup>1</sup>, 王茜<sup>1</sup>, 靳荣线<sup>1</sup>, 和文祥<sup>2</sup>, 薛泉宏<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 云南大学云南省微生物研究所, 微生物药物国家工程研究中心, 昆明 650091)

(<sup>2</sup> 西北农林科技大学资源环境学院, 西安 712100)

**摘要:**【目的】探索超声波处理土壤悬液, 增加稀有放线菌的类群。【方法】将西双版纳热带雨林的混合土样, 制成土壤悬液, 用超声波分别处理 0-120 s, 用平板稀释法分离放线菌, 得到纯菌落后测定其 16S rRNA 基因序列, 进行系统发育分析, 将分离菌株鉴定到属; 用超声波处理已经鉴定到种且常见的 10 种链霉菌 0-5 min, 后进行培养, 测定其存活率。【结果】土壤悬液经超声波处理不同时间, 放线菌的数量和种类逐渐增加。超声波处理已知链霉菌 1-5 min, 对链霉菌的数量没有明显影响。【结论】用超声波处理土壤悬液 40 s, 可以大大增加放线菌的出菌总数, 明显增加稀有放线菌的种类, 是一种经济且简便易行的方法。

**关键词:** 放线菌; 分离方法; 超声波

**中图分类号:** Q939   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-04-1094

目前临床和农业应用的抗生素约 150 种左右, 其中用放线菌生产的就有大约 120 种<sup>[1]</sup>。迄今为止, 从放线菌开发药物先导物仍然是天然药物开发的主流之一。为了获得新的药物先导物, 获得大量未知菌或新物种是重要条件之一<sup>[2]</sup>。经过 60 多年大规模的开发, 大量放线菌被分离、筛选和描述, 很多菌种多次被“发现”和描述。根据国内外的研究结果, 迄今尚有 90% 以上的微生物不能够纯培养<sup>[3-6]</sup>, 放线菌亦然。早在 2004 年焦瑞身<sup>[7]</sup>就指出, 分离未培养的微生物是新世纪微生物学家的一项重要任务。现在要获得新的放线菌是越来越困难了。而未知菌和已知菌又是不断消涨的, 今天是未知菌, 明天就可能成为已知菌, 分离方法就要随之不断改进。

生活于土壤中的放线菌和其它微生物通常与土壤颗粒紧密结合, 或被土壤颗粒包裹, 在振荡提取时不易从土壤团粒游离出来。因此, 如何打破土壤团粒束缚, 将团粒内与之胶联的菌体释放出来, 使菌体

均匀地分散到溶液中, 是增加未知菌的重要条件之一。我们用超声波处理土壤悬液, 用平板稀释法分离放线菌, 大大提高了稀有放线菌的类群。现报告部分结果。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:** 土壤样品采自云南西双版纳原始热带雨林, 该地区海拔为 460-800 m。共采 20 份土样(每份由 3-5 个点 10-20 cm 土样混合而成), 装入无菌塑料袋中, 于 4℃ 保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 溶菌酶、蛋白酶 pK、dNTPs、Taq 酶等购自上海生工生物工程技术服务有限公司, Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司, 其余试剂为国产分析纯试剂。电泳仪购自 Bio-RAD 公司, PCR 仪购自德国 Biometra 公司。槽式超声波清洗器(型号为 SK3300H, 160 W, 59 KHz)购自上海科导超声仪器有限公司制造。

**基金项目:** 国家自然科学基金(30900002, 30600001, 重点项目 U0932601); 国家科技部重点国际合作项目(2006DFA33550)

**作者简介:** 姜怡(1978-), 女, 云南人, 德国基尔大学博士, 从事放线菌资源研究。Tel: +86-871-5034139; Fax: +86-871-5173878; E-mail: jiangyikm@hotmail.com

**收稿日期:** 2010-01-27; **修回日期:** 2010-04-28

## 1.2 土样处理

将 20 份土样充分混合成 1 份, 在室温风干 1 周, 磨成粉末, 称取 8 份, 每份 2 g, 80℃ 干热处理 1h。放入 18 mL 无菌 0.1% 的  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  溶液, 150 r/min 摇 60 min, 制成土壤悬液。土壤悬液分别用槽式超声波清洗器分别处理 10 s、20 s、30 s、40 s、50 s、60 s, 分别用 9 mL 无菌 0.1%  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  溶液, 再连续稀释 2 次(最终稀释度为 1000 倍), 每个培养皿取 0.1 mL, 涂布于分离平板。

## 1.3 放线菌分离方法及培养基

采用两种培养基。YIM 171·琼脂: 甘油 10 g, 门冬酰胺 1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CaCO}_3$  0.3 g, 微量盐<sup>[8]</sup> ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g, 水 100 mL) 1 mL, 复合维生素(核黄素 1 mg、烟酸 1 mg、泛酸钙 1 mg、肌醇 1 mg、生物素 1 mg、P-氨基苯甲酸 1 mg、 $\text{VB}_1$  1 mg、 $\text{VB}_6$  1 mg)<sup>[9]</sup>, 琼脂 20g, 水 1000 mL, pH 7.2 - 7.4, 抑制剂: 重铬酸钾 50 mg/L, 奈啉酸 25 mg/L。YIM 212(海藻糖-脯氨酸培养基)<sup>[10]</sup>, 加制霉菌素 100 mg/L, 放线菌酮 50 mg/L, 奈啉酸 25 mg/L。

采用平板稀释法分离放线菌。28℃ 培养 21 d, 处理 0 - 60 s 的培养皿, 进行菌落计数; 处理 0 s、40 s、120 s 的培养皿, 挑菌于 ISP 2<sup>[8]</sup> 斜面, 并保存于 20% 的甘油(-20℃)。

本实验重复 2 次, 菌落数(CFU)是两次计数的平均值, 取整数。

## 1.4 菌种鉴定

菌株的培养, DNA 提取, PCR 及 16S rRNA 基因的序列分析按照以前的文献进行<sup>[11]</sup>。菌株鉴定到属的水平。

## 2 结果和讨论

### 2.1 超声波处理对放线菌出菌率的影响

图 1 是超声波处理土样悬液对放线菌出菌率的影响。经过 150 W 超声波处理的样品, 放线菌数量较不处理(对照)有显著变化, 不处理的平板, 平均只有 7 个菌落。随着超声波处理时间的延长, 放线菌的菌落数呈上升趋势, 处理 10 s 有 13 个菌落, 处理 40 s 时达到最大值的 41 个菌落, 是对照组的近 6 倍。处理时间再延长, 放线菌的出菌数呈现减少趋势, 处理 60 s 时降到 29 个。

用超声波处理, 对细菌数量影响不明显, 不处理有 6 个菌落, 处理 20 s 有 14 个, 处理 40 s 有 13 个, 但都不影响分离放线菌。这是由于培养基加入重铬

酸钾等抑制剂, 抑制了细菌的生长。

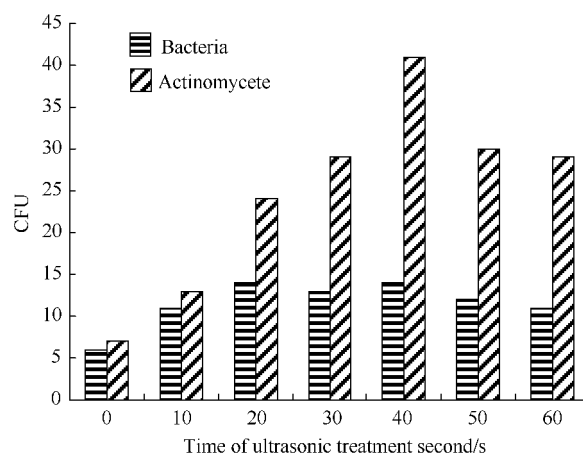


图 1 超声波处理不同时间对放线菌出菌率的影响

Fig. 1 Influence of the different time using ultrasonic treatment on CFU of actinomycete. The CFU are the averages of two times of test.

### 2.2 不同处理时间对放线菌种类的影响

根据上述结果, 用相同土样、相同培养基, 专门做了超声波处理 40 s、120 s, 及不处理(对照)的分离实验, 只是土样悬液增加为 0.25 mL/培养皿。分离到纯菌落后, 将菌株鉴定到属(表 1)。表 1 表明, 土壤悬液

表 1 超声波处理对放线菌组成的影响

Genus	0 s	40 s	120 s
<i>Actinomadura</i>	+	+	+
<i>Actinoplanes</i>		+	
<i>Actinopolymorpha</i>		+	
<i>Agrococcus</i>			+
<i>Agromyces</i>		+	
<i>Arthrobacter</i>			+
<i>Citricoccus</i>			+
<i>Dactylosporangium</i>	+	+	
<i>Friedmanniella</i>		+	
<i>Kribbella</i>		+	
<i>Lentzea</i>		+	
<i>Microbacterium</i>		+	
<i>Micromonospora</i>	+	+	+
<i>Mycobacterium</i>		+	
<i>Nocardia</i>	+	+	+
<i>Nocardioidea</i>	+	+	+
<i>Nonomuraea</i>		+	
<i>Oerskovia</i>			+
<i>Pseudonocardia</i>	+	+	
<i>Promicromonospora</i>		+	
<i>Rhodococcus</i>	+	+	+
<i>Saccharopolyspora</i>		+	+
<i>Sphaerisporangium</i>	+	+	
<i>Streptomyces</i>	+	+	+
<i>Streptosporangium</i>		+	+
Total:	9 genera	21 genera	12 genera

不处理(对照)获得纯培养 37 株,经鉴定,属于链霉菌等 9 个属,大多是比较常见的放线菌,链霉菌占 65%。超声波处理 40 s,放线菌的种类大大增加,分离菌株 89 个,经鉴定,有 21 个属,除了对照组分离到的 9 个属以外,增加了 12 个属,其中球孢囊菌属(*Sphaerisporangium*)、多形放线菌属(*Actinopolymorpha*)、弗莱德门属(*Friedmanniella*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)、伦茨氏菌属(*Lentzea*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)等是比较少见的放线菌。超声波处理 120 s,放线菌总数减少,鉴定的 54 株,属的组成也减少为 12 个属,与对照、40 s 处理比较,增加了农球菌(*Agrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、柠檬球菌属(*Citricoccus*)和厄氏菌属(*Oerskovia*)等稀有放线菌,链霉菌占 69%。在两种处理和对照组,链霉菌都是菌落最多的;马杜拉放线菌、链孢囊菌、诺卡氏菌和红球菌属的菌株也都能分离到。

### 2.3 超声波处理对常见链霉菌存活率的影响

为了查明放线菌中孢子化程度最高的链霉菌对超声波的忍耐性,用本次实验分离到的链霉菌,鉴定到种(与已知菌的 16S rRNA 基因相似性在 99.8% 以上),选出培养特征差别较大的 10 个种,分别做成孢子悬液,用超声波处理 1–5 min,做稀释平板,培养一周后,分别计数(表 2)。从表 2 可以看出,每种链霉菌经超声波处理 1–5 min,随着处理时间的延长,菌落数略有减少,但差别并不大。可见在 160 W, 59 KHz 的强度下,超声波处理 1–5 min 范围内,对实验的 10 种常见链霉菌无明显的杀死作用。

表 2 超声波对 10 种常见链霉菌的出菌率  
Table 2 An influence of ultrasonic on colony number of usual *Streptomyces*

Name of species	Min of ultrasonic treatment				
	0	1	2	3	5
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	913	913	906	886	796
<i>Streptomyces argenteolus</i>	1012	1002	912	892	862
<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	26	24	27	10	15
<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	858	855	823	833	745
<i>Streptomyces griseoflavus</i>	61	58	48	61	46
<i>Streptomyces intermedius</i>	366	366	332	376	306
<i>Streptomyces krainskii</i>	248	248	256	243	217
<i>Streptomyces macrosporeus</i>	173	172	136	155	133
<i>Streptomyces mediolani</i>	48	44	39	33	36
<i>Streptomyces tendae</i>	915	912	853	866	814

上述结果说明,超声波发生器发出的高频振荡信号,通过换能器转换成高频机械振荡而传播到介质,促使吸附在土壤团粒内的微生物游离到土壤悬液中,能增加放线菌的数量和类群;由于各种放线菌与土壤团粒吸附紧密的程度不同,经超声波处理后,

从团粒解析下来的快慢就会不同;超声波也有杀死微生物的作用,各种微生物对超声波的耐受性也会不同。因此,超声波处理土壤悬液,对微生物的作用,实际上是一个吸附、解析、致死的动态过程。在我们的实验条件下,仅仅用摇床振荡提取(对照),只分离到 9 个属的放线菌,大多是常见放线菌,而且是孢子化程度较高的放线菌,它们是最容易从土壤团粒解析下来的菌种;超声波处理到 40 s 时,放线菌的数量和种类都达到峰值,数量增加约 6 倍,种类从 9 个属增加到 21 个属,显然是很多被从团粒内解析下来而又存活着的稀有放线菌大量增加的结果;当处理 2 min 时,较晚解析出来、而未被杀死的菌种(农球菌,节杆菌属,柠檬球菌属和厄氏菌属)存活下来,那些孢子化程度低、解析较早、忍耐力弱、且数量少的菌种可能致死,而孢子化程度高(链霉菌、马杜拉放线菌、链孢囊菌等),忍耐力较强的菌种却存活下来,因此,稀有放线菌的种类减少,链霉菌等的比例反而有所增加。

稀释平板法是一种古老而又广泛沿用至今的放线菌分离方法。半个多世纪以来,各国学者对其进行了不断的改进,为抗生素开发提供了数不清的菌源。分离未培养的微生物是开发利用的前提之一。为了分离那些尚未纯培养的放线菌,重要前提之一是排除已知菌。第一要排除真菌、细菌的干扰,目前我们采用的两组抑制(制霉菌素、放线菌酮与奈啶酸,重铬酸钾与奈啶酸)都有很好的效果。第二,在大多数环境样品中,链霉菌几乎都是优势菌,一般占放线菌总数的 90% 以上;链霉菌又是研究最多,已知菌比例最大的菌群;但是未知链霉菌又是分离的重要目的菌。为了排除已知或常见链霉菌,有的学者采用噬菌体处理样品<sup>[12]</sup>,以减少常见链霉菌的出菌率,但是带来的后果是分离到的放线菌有可能感染噬菌体,而噬菌体是研究开发过程要尽量避免的,这并不是最好的方法。本实验的结果表明,难于用超声波处理来避免常见链霉菌的出现,研究人员必须另寻出路。

超声波处理能显著增加稀有放线菌的种类,是一个简便、快捷、低成本的方法,很容易在放线菌分离中应用。我们用超声波处理 200 多份采自不同地区的土壤样品 40 s,都大大提高了稀有放线菌的类群,结果令人满意。由于不同来源的土壤,其性质各不相同,微生物的组成及与土壤团粒吸附程度也不相同;各种微生物对超声波的耐受能力各异;超声波仪的功率不同。所以在应用时,建议根据分离目的、

样品来源、超声波发生器的型号、功率,设计不同频率、不同处理时间来处理土壤悬液,以找到“最佳”功率和“最佳”的处理时间。

## 参考文献

- [ 1 ] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites, a personal review. *Journal of Antibiot*, 2005, 58(1): 1-26.
- [ 2 ] Jiang Y, Cao YR, Wiese J, Lou K, Zhao LX, Imhoff JF, Jiang CL. A new approach of research and development on pharmaceuticals from actinomycetes. *Journal of Life Science US*, 2009, 3(7): 52-56.
- [ 3 ] Shayne JJ, Philip H, Parveen S, Catherine AO, Peter HJ. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environment Microbiology*, 2003, 69: 7210-2715.
- [ 4 ] Pachter L. Interpreting the unculturable majority. *Nature Methods*, 2007, 4: 479-80.
- [ 5 ] Zengler K, Toledo G, Rappe M, Elkins J, Mathur EJ, Short JM, Keller M. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2002, 99: 15681-15686.
- [ 6 ] Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannanet BJM. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environment Microbiology*, 2001, 67: 4399-4006.
- [ 7 ] 焦瑞身. 新世纪微生物学者的一项重要任务—未培养微生物的分离培养. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2004, 20: 641-645.
- [ 8 ] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16: 313-340.
- [ 9 ] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65: 501-509.
- [ 10 ] 姜怡, 段淑蓉, 唐蜀昆, 陈华红, 李文均, 徐丽华. 稀有放线菌分离方法. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2006, 33(1): 181-183.
- [ 11 ] 曹艳茹, 姜怡, 陈以光, 唐蜀昆, 秦盛, 赵国振, 徐丽华. 武陵山放线菌多样性. *微生物学报 (Acta Microbiol Sinica)*, 2008, 48(7): 1-7.
- [ 12 ] Kurtböke DI. Use of bacteriophage for the selective isolation of rare actinomycetes, p. 10-54. In Kurtböke DI (ed.), *Selective Isolation of Rare Actinomycetes*. Queensland Complete Printing Services, Nambour, Australia, 2003.

## Ultrasonic treatment of soil samples for actinomycete isolation

Yi Jiang<sup>1\*</sup>, Yanru Cao<sup>1,2</sup>, Lixing Zhao<sup>1</sup>, Qian Wang<sup>1</sup>, Rongxian Jin<sup>1</sup>, Wenxiang He<sup>2</sup>, Quanhong Xue<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education of China, Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

(<sup>2</sup>College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] We used ultrasonic to treat soil samples to isolate rare actinomycetes strains. [ **Methods** ] We collected and suspended soil samples from mix tropical-rain-forest in Xishuangbanna. Farther, we treated the soil suspension with ultrasound for 10 to 120 s and used the plate dilution method to isolate actinomycetes. After got pure colonies, we sequenced their 16S rRNA gene sequences and calculated to put in phylogenetic analysis. The isolates were identified to the genus. We treated 10 kinds of common and identified *Streptomyces* with 1–5 min using ultrasonic, and then were cultured to measure their survival rate. [ **Results** ] The soil suspensions treated with different times by the ultrasonic, actinomycetes gradual increased in the number and types. Ultrasonic treating of known *Streptomyces* with 0–5 min, there was no significant effect on the survival number of *Streptomyces*. [ **Conclusion** ] The ultrasonic treating with soil suspensions for 40 s can significantly increase the total number of actinomycetes and the types of rare actinomycetes. Thereby, it is an economic and simple method to apparently increase the types of rare actinomycetes in the isolation.

**Keywords:** Actinomycetes; Isolation methods; Ultrasonic

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900002, 30600001, U0932601) and the International Cooperative Program of The Ministry of Science of Technology, P. R. China (2006DFA33550)

\* Corresponding author. Tel: +86-871-5034139; Fax: +86-871-5173878; E-mail: jiangyikm@hotmail.com

Received: 27 January 2010/Revised: 28 April 2010