

放线菌的不同分离纯化方法概述

丁盼

(皖北卫生职业学院, 安徽 宿州 234000)

摘要:为解决新化合物开发日益困难的问题,许多人把目光投向特殊环境放线菌的研究,这一类放线菌能够在特殊环境中长期生长,具有独特的基因类型、特殊的生理机制,从而产生特殊的代谢产物,本文对皇藏峪不同生境放线菌进行分离研究,提出稀释倒平板法和内生菌分离法进行放线菌的纯培养,以期获得更多的放线菌资源,为开发利用特殊环境条件下放线菌提供了物质基础和参考。

关键词:放线菌;分离方法;稀释法;多样性

中图分类号:S567

文献标识码:A

文章编号:1004-7344(2021)39-0181-02

1 放线菌的分离意义

放线菌是一种比较常见的微生物资源,与人类的生产和生活都具有密不可分的关系,在药品研发和工农业方面具有非比寻常的意义^[1]。筛选有活性的放线菌,一直是新抗生素研究乃至新药研发的主要来源。目前已经研发的抗生素,大概有70%~80%源于放线菌^[2]。一些特殊的放线菌,还能产生各种酶制剂(脂肪酶、果胶酶等)、各种酸等。但是,现在通过纯培养在方式已经分离出的放线菌,仅占其总数的10%~20%,也就是说,普通的分离方法,不能分离获得绝大部分的新放线菌。如何很好地开发并最大限度地利用一些并不为人们熟悉的放线菌资源,是目前微生物学研究非常重视的工作^[3]。

除此以外,放线菌还能够分解各种各样的有机物,比如纤维素、木质和一部分毒性很强的化合物。所以,放线菌不单单在自然界的微生物分解中很有意义,也在污水处理和一些固体垃圾的处理中发挥实用价值,还可以帮助土壤组成颗粒成分,从而疏松营养土质。弗兰克菌属为非豆科木本植物根瘤内共生菌,有着非常强悍的固氮能力。

2 放线菌的分离方法

作为抗生素的主要来源,放线菌是很宝贵的菌种,多存在于土壤之中。在中性略碱性、营养充足、氧气充足的土壤中出现比例较高^[4]。但是,土壤中的微生物不是单一的种类,是各种细菌,放线菌和真菌家族中重要的成员之一。为了研发利用有活性的微生物,就需要把放线菌从庞大的微生物家庭中分离出来,最终得到某一菌株的纯培养。按照放线菌的需求、温度、湿度等不同条件,多选择合成培养基进行^[5]。假若培养基的组成变化,或土壤提前做好相关处理,120℃热处理达1h以上,也可以添加一些特殊的抑制成分,从而让细菌,霉菌的出现很大意义降低,达到淘汰杂菌的目标。再利用稀释法,让放线菌能够于固体培养基上

生长出独立的菌落菌落,接着再不断纯化。分离放线菌的办法非常之多,除了常见的稀释法,也有所谓的弹土法、混土法和喷土法等^[6],尽可能分到更多的放线菌菌种资源。

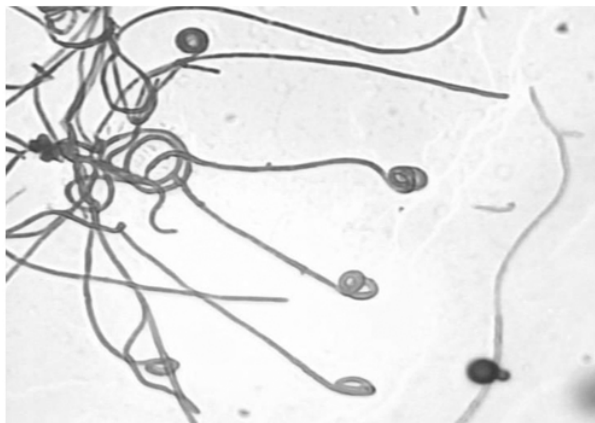


图1 显微镜下的放线菌

2.1 放线菌的稀释法

制备培养基:量取适量的可溶性淀粉,加入盛着少量水的容器之中,快速借助玻璃棒把淀粉搅合成粘稠状,然后添少于所需水的开水里,接着加热,让淀粉全部溶解均匀。其次称量别的各成分,逐渐把他们溶解。至于 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,提前制备浓度高的贮备液,再加入慢慢加入之中,具体措施为:取10mL去离子水,然后加入0.1g的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,这样0.01g/mL溶液母液就制备好了。接着,稀释1000倍,就得到了所需浓度的溶液。等到全部成分溶解之后,逐渐添加去离子水,直至达到需要的总体积,用氢氧化钠和盐酸溶液,精确调节酸碱度,分装到合适的三角烧瓶中,然后用封口膜封住瓶口,至于高压蒸汽灭菌锅中高压灭菌30min备用。

土样的初步处理:随机抽不同地点的土壤100g,放置于通风

的地点,慢慢风干,由深色逐渐转为浅色,接着用研钵一点点地磨碎,过直径是 840 μ m(20 目)的筛子。事先准备好干净的报纸,把土样裹到里边,裹好后,放到电热鼓风干燥箱中,60 $^{\circ}$ C,干热处理 1h 左右。

精确地量好准备检测的样品 10.0g,然后准备一个 500mL 的三角烧瓶,加入 90mL 的灭过菌的去离子水到瓶子里,不停地来来回回振荡 10min 左右,这样就初步配成 10^{-1} 稀释浓度的土壤液。接着要用到移液管,移液管量取 1mL 刚刚配好的土壤液,放到盛了 9mL 灭过菌的去离子水的试管中,进一步摇晃均匀,这样,就调配成 10^{-2} 的土壤液,依照这个办法,不停地稀释下去,就可以调成 10^{-3} , 10^{-4} 的土壤液。借助平板表面成菌落法,以此来检验土壤中微生物的大致数量。将稀释好的不同稀释度 (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) 的土壤液,用另一只比较干净的移液管,取 0.2mL 土壤悬液接种在不同的稀释液体里。然后逐渐风干样品、干热过程为了尽可能减少细菌和真菌的数量;这时,添加适量的重铬酸钾,以此极大地遏制其他细菌和真菌的生长,同时,一点不影响放线菌的进一步生长^[9]。

2.2 放线菌的弹土分离法

土壤准备与接种:把土壤用研钵来回研磨,通过筛子,取少量细土,放于已经高温高压灭过菌的比较好清理的硬纸板上,纸的直径稍微大于培养皿的直径。此时,把多余的土慢慢敲去,不可用力太大。最后,纸板上剩下一层非常细微的土粒粘附着,是较为满意的情况。然后,接种时把倒好培养基的盖子,轻轻打开,将土壤纸板粘土向着下方,慢慢地插入覆盖上边,用盖轻轻触碰到纸板,然后尽快抽出来,最后,盖好盖子,倒置,即接种完全接种完成。剩下的土壤纸板,接着放到第二、第三及第四套培养皿中去。当进行到第 2 套的时候,小心拨动一下板子。当进行到第三、第四套皿接种时,需要加大力度,在纸板背面增加弹的力量,让纸板上剩下的部分颗粒落下,尽可能达到控制理想的出菌率。当然,倘若是准备分离罕见的放线菌,如小单孢菌、极端环境放线菌等,采用的方法是,把土壤充分研磨,等魔细再做干热处理(120 $^{\circ}$ C下处理 1h 左右)。如此下来,尽可能地减少细菌、霉菌和链霉菌的数量,让稀有放线菌出现成为可能,甚至出菌率不断提高^[9]。

2.3 植物内生放线菌的分离

植株的采集与预处理:采集非常健康、无病害和虫害的植株作为采集目标^[9]。同时,也要除去植物表面附着的微生物,除去附着的土壤颗粒,把植物用灭过菌的去离子水清洗时用超声波协助进行初步处理。

消毒程序:我们最常选的消毒液是次氯酸钠,它的使用浓度大多设定在 5%;当然,进行消毒处理时,少量滞留于植物外在的次氯酸钠有机会消灭内生菌,也有可能对内生菌造成很强的抑制作用,以至于植株在培养基中根本就无法形成菌落^[9],所以,一般经过了次氯酸钠的初步处理后,迅速添进去硫代硫酸钠溶液,从而酸碱中和。分离内生放线菌时,可以选在植株进行初步的消毒后,把它浸泡在 5%~7%NaHCO₃ 中去,以基本保障植物样品全部成呈弱碱性,对于放线菌的分离工作有很好的作用。

分离培养基:根据具体的要求,可以暂定比较合适的分离培养基(如 ISP2 培养基、淀粉-精氨酸培养基、海藻糖-脯氨酸培养基等一系列不同的培养基)。最后在培养基中,加入萘啶酮酸抑制细菌、制霉菌素真菌生长。

土壤中的放线菌种类较多,数量丰富。一般条件下,放线菌喜欢、弱碱性、营养充足的土壤中占有的数量居多^[9]。由于地理环境、不同植物,土壤酸碱性质及土质的差异,放线菌的种类、数量和生物学活性,当然也千差万别。比如:从过冷的土壤中能够分离到大量的嗜冷放线菌,从淡水环境中能够获得嗜碱性的和嗜酸性的放线菌,从海水中能获得嗜盐放线菌^[9]。据研究显示,土壤中含有的放线菌比例最高的往往是链霉菌,研究人员习惯把除链霉菌以外的放线菌,一律称为稀有放线菌,它们是生物活性物质分离极为关键的菌种来源。

放线菌是一大类极其重要的微生物资源,是一个丰富的资源家族。放线菌与人类关系非常密切,分离放线菌有比较重要的价值^[9],从中分离重要经济开发利用价值的微生物来为人类服务,对于研究生物多样性、生态系统的平衡等也具有重要的意义。

参考文献

- [1] 冯轶男,杨润清.放线菌分离与筛选方法的研究进展[J].生物技术,2010(4):97-100.
- [2] 杜慧竟,苏静,余利岩,等.药用植物内生放线菌的分离和生物学特性[J].微生物学报,2013,53(1):15-23.
- [3] 魏玉珍.广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J].微生物学通报,2010,37(6):823-828.
- [4] 陈正军,关统伟,张利莉.新疆硝尔库勒盐湖放线菌分离方法的初步研究[J].塔里木大学学报,2012,24(2):50-55.
- [5] 范丽霞,郑继平,杨先会.土样自然风干时间对放线菌分离的影响[J].海南医学院学报,2010,16(3):280-281.
- [6] 唐依莉,王蓉,洪葵.不同红树林地区老鼠筋内生放线菌的分离及其环境适应性[J].微生物学通报,2012(1):25-32.
- [7] 郑倩,孙玉萍,魏婕,等.新疆特色药食两用植物恰玛古内生放线菌的分离与鉴定[J].生物资源,2020,42(6):691-697.
- [8] 关统伟,赵珂,夏占峰,等.新疆高盐环境土壤放线菌分离培养基比较[J].应用与环境生物学报,2010,16(3):429-431.
- [9] 陈萌.川楝内生放线菌的分离及多样性研究[J].微生物学通报,2015,42(2):264-271.
- [10] 薛清,段春梅,王玲娜,等.微波处理对钙质土壤放线菌分离效果的影响[J].微生物学杂志,2010,30(3):19-24.
- [11] 裴冬丽,张红岩,刘苗,等.药用植物麦冬土壤中拮抗放线菌的分离和筛选[J].广东农业科学,2015,42(1):61-63.
- [12] 姜怡,曹艳茹,王茜,等.波罗的海放线菌的多样性[J].微生物学报,2011(11):36-42.

收稿日期:2021-09-01

作者简介:丁盼(1986—),女,汉族,安徽宿州人,硕士研究生,讲师,主要从事微生物相关的教科研工作。