

· 研究论文 ·

土壤稀有放线菌的选择性分离及其抗菌活性研究

黄路枝, 胡兆农*, 郭正彦, 吴文君

(西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 在优化土壤稀有放线菌选择性分离方法的基础上, 对从安徽、浙江、山东、陕西等地采集的 31 份土样中的稀有放线菌进行了选择性分离。结果表明: 以改进的 HV 培养基为分离培养基, 将土壤样品稀释 100 倍, 添加 2×10^{-5} g/mL 重铬酸钾 + 2×10^{-5} g/mL 萘啶酮酸 + 1×10^{-5} g/mL 卡那霉素作为抑制剂分离效果最好。以常见植物病原真菌和细菌为指示菌, 从分离的 417 株放线菌中筛选出 H32、H75、H223、H227、H238 等 5 株可代谢抗菌活性物质的菌株。离体条件下, 5 株放线菌菌株发酵液对小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana*、玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternata* 的菌丝生长和孢子萌发均有强烈的抑制作用, 其中 H223 和 H238 菌株发酵液对病原真菌菌丝生长的抑制中浓度 (EC_{50}) 值均小于 10 mL/L; H32 菌株发酵液对小麦根腐病菌、玉米大斑病菌、烟草赤星病菌孢子萌发的 EC_{50} 值分别为 25.5、28.9 和 29.9 mL/L。5 株放线菌发酵液对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌抑制作用显著, 其中 H223 菌株发酵液抑制作用最强, 抑菌圈达 30 mm 以上。盆栽实验结果表明, 5 株放线菌发酵液对小麦白粉病的保护效果为 73.45% ~ 82.35%, 治疗效果为 67.74% ~ 70.80%。

关键词: 稀有放线菌; 选择性分离; 抗菌活性

中图分类号: S482.28

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)01-0059-07

Study on Selective Isolation and Antibiotic Activity of Rare Actinomycetes from Soil

HUANG Lu-zhi, HU Zhao-nong*, GUO Zheng-yan, WU Wen-jun

(Institute of Pesticide Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract Based on an improved selective isolation techniques, 31 soil sample collected from Anhui, Zhejiang, Shandong, Shaanxi et al provinces of China were screened. The result showed that when use the improved HV agar as the isolation medium, dilute the soil sample 100 times and use 2×10^{-5} g/mL potassium dichromate plus 2×10^{-5} g/mL nalidixic acid plus 1×10^{-5} g/mL kanamycin as inhibitor the isolation was the best. All the fermentation of the screened 417 strains were tested against the plant pathogenic fungi such as *Bipolaris sorokiniana*, *Exserohilum turcicum*, *Alternaria alternata*, and pathogenic bacteria, such as *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. Five of them have been proven to produce bioactive metabolites, which were labeled as H32, H75, H223, H227, H238 respectively. By means of mycelium growth rate, the fermentations of H223 and H238

收稿日期: 2006-10-08 修回日期: 2006-11-15

作者简介: 黄路枝 (1982-), 女, 硕士研究生; * 通讯作者: 胡兆农 (1970-), 男, 博士, 副教授, 主要从事农药毒理学研究。联系电话: 029-8709219; E-mail: mlrhuang@yahoo.com.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 ("973" 计划) 项目 (2003CB114404)。

showed the best inhibitive action, both EC_{50} value swere were less than 10 mL/L. Spore germination tests showed that the fermentation of H32 exhibited the strongest antibiotic activity against *Bipolaris sorokiniana*, *Exserohilum turcicum*, *Alternaria alternata*, the EC_{50} values were 25.5, 28.9, 29.9 mL/L, respectively. Cup-plate tests indicated that the fermentations of the 5 strains had significant activities against *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, and the inhibitive diameters of the fermentation of strain H223 to the 3 bacteria were all more than 30 mm. Pot tests on *B. graminis* exhibited that the protective efficacy of fermentations of the 5 strains were 73.45% ~ 82.35%, therapeutic efficacy were 67.74% ~ 70.80%.

Key words rare actinomycetes, selective isolation, antibiotic activity

放线菌是极具代谢多样性的微生物,迄今为止,世界上已发现的抗生素大约由三分之二是由放线菌产生的,其中70%以上由链霉菌产生^[1,2]。随着具有生物活性的菌株被大量地发现,再用传统方法分离放线菌往往造成重复研究,使从中发现新化合物的几率降低^[3,4],这使得继续从链霉菌中寻找新的抗生素变得日益困难。稀有放线菌是指那些用传统方法分离时分离频度远远低于链霉菌的放线菌,通常意义上是指非链霉菌^[4]。日本、美国、英国等国家对稀有放线菌研究较早,但其分离程序长期以来均被各国作为技术机密加以保护。我国自20世纪90年代开始对稀有放线菌分离方法进行立项研究^[3],已发展了不同类型放线菌的高选择性分离方法^[3-6],并相继在《国际系统与进化微生物杂志》(IJSEM)上陆续发表新的科、属和种^[7-13]。

在微生物药物开发中,一条重要的策略是分离那些未被开发且同时又是次级代谢产物良好生产者的微生物群体^[14]。虽然稀有放线菌越来越被证明具有产生新化合物的潜力,但对其遗传和生理学知识还知之甚少,而发展新的稀有放线菌分离方法对于扩展我们对稀有放线菌的生态学、分类学和生物活性的理解至关重要^[15]。

笔者以改进的选择性分离方法对31份不同来源的土壤样品进行了稀有放线菌的选择性分离及其抗菌活性的研究。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 土样 采自安徽、浙江、山东、陕西等地不同环境的土壤样品31份。

1.1.2 培养基

①改进的HV培养基:淀粉2g 硝酸钾0.5g

氯化钾1.7g 硫酸镁0.5g 磷酸氢二钠0.5g 碳酸钙0.02g 硫酸亚铁0.01g 硫酸素0.5mg 烟酸0.5mg 泛酸0.5mg 对-氨基苯甲酸0.5mg 核黄素0.5mg 维生素B60.5mg 肌醇0.5mg 生物素0.25mg 琼脂15~18g 蒸馏水1000mL, pH 7.2。

②改进的Bennet培养基:葡萄糖10g 酪蛋白水解物2g 酵母膏2g 牛肉膏1g 放线菌酮30mg 琼脂15~18g 蒸馏水1000mL, pH 7.0。

③葡萄糖-天门冬素琼脂培养基:葡萄糖10g 天门冬素0.5g 牛肉膏2.0g 磷酸氢二钾0.5g 琼脂15~18g 蒸馏水1000mL, pH 7.2。

④改进的酵母膏-麦芽膏培养基:葡萄糖15g 酵母膏4g 麦芽膏10g 琼脂15~18g 蒸馏水1000mL, pH 7.0。

⑤小米液体培养基:小米10g 葡萄糖10g 碳酸钙2g 氯化钠2.5g 蛋白胨3g 蒸馏水1000mL, pH 7.2~7.4。

⑥PDA培养基:马铃薯200g 葡萄糖20g 琼脂15~18g 蒸馏水1000mL, pH 7.0。

⑦BP培养基:牛肉膏3g 蛋白胨10g 氯化钠5g 琼脂15~18g 蒸馏水1000mL, pH 7.0。

1.1.3 抑制剂 卡那霉素(Japan Biotech), 萘啶酮酸(Sigma Biotech), 利福平(北京鼎国生物技术的发展中心,生化试剂), 重铬酸钾, 苯酚(国产,分析纯)。

1.1.4 供试病原真菌和细菌 病原真菌:小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana*, 玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*, 烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*, 小麦白粉病菌 *Blumeria graminis* 细菌: 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*, 大肠杆菌 *Escherichia coli*, 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 以上

病菌均由西北农林科技大学农药研究所提供。

1.1.5 供试植物 小麦 *Triticum aestivum*, 品种为辉县红。

1.2 测定方法

1.2.1 稀有放线菌的选择性分离及菌株培养 土样经自然风干,过筛,称重,110℃干热 1 h^[15]。在制好的分离培养基中加入 2×10^{-5} g/mL 的重铬酸钾,分别设置空白、萘啶酮酸、卡那霉素、利福平、萘啶酮酸+卡那霉素 5 种处理,其中萘啶酮酸的浓度为 2×10^{-5} g/mL,卡那霉素的浓度为 1×10^{-5} g/mL,利福平的浓度为 0.5×10^{-5} g/mL。每处理重复 3 次。

稀有放线菌的分离:采用稀释平板法,将预处理的土壤样品用无菌水稀释成 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 倍的悬浮液,加入质量分数为 1.5% 的苯酚,充分振荡,处理 30 min。取 0.1 mL 上清液,用三角玻棒在制好的平板上涂抹均匀。

将分离培养皿置于 28℃ 恒温培养箱中培养

$$\text{菌丝生长抑制率}(\%) = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径} - 4} \times 100 \quad (1)$$

毒力测定时,在无菌条件下,将制备好的发酵液上清液用融化的 PDA 培养基依次配制成含 0.6、2.5、12.5、25、50、100 mL/L 系列浓度发酵液的平板培养基,其他方法同上。最后根据不同浓度的抑制率计算毒力^[16]。

1.2.3.2 抑制孢子萌发法^[16,17] 取供试病原菌的孢子配成适当浓度的菌悬液(10×10 低倍镜下,每视野 30~40 个孢子为宜),将发酵液与孢子悬

$$\text{孢子萌发抑制率}(\%) = \frac{\text{对照孢子萌发率} - \text{处理孢子萌发率}}{\text{对照孢子萌发率}} \times 100 \quad (2)$$

毒力测定时,将发酵液与供试病原菌配制成 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 mL/L 系列浓度的孢子悬浮液,测定方法同上。最后根据不同浓度的抑制率计算毒力^[16,17]。

1.2.3.3 管碟法 将培养好的供试病原菌制成菌悬液,与适量 BP 培养基充分混匀,在无菌条件下制成带菌平板,每皿等距离放置 4 个牛津杯。每杯中接入发酵液 0.2 mL,置于 25℃ 的恒温箱中培养,24 h 后测量抑菌圈直径^[16]。试验重复 3 次。

1.2.3.4 盆栽试验

①保护作用测定:先在盆栽植株上均匀喷洒

7~30 d,观察菌落生长情况,将单菌落挑出,纯化培养。纯化后,用改进的酵母膏-麦芽膏培养基培养。

1.2.2 发酵液制备 在 250 mL 三角瓶中装入 100 mL 小米液体培养基,灭菌后接入 10 mL 放线菌孢子悬浮液,180~190 r/min、30℃ 下振荡培养 4~10 d,过滤,滤液于 3 000 r/min 下离心 15 min,取上清液备用。

1.2.3 抗菌活性测定

1.2.3.1 抑制菌丝生长速率法^[16] 无菌条件下,取制备好的发酵液上清液 1 mL,用融化的 PDA 培养基 9 mL 在无菌培养皿中制成含发酵液平板培养基,并设空白对照。在每个培养基表面放入 1 个供试菌的菌饼(φ 4 mm),使菌饼带菌丝的一面贴在培养基表面,每处理 3 次重复。28℃ 恒温培养 3~4 d 后,十字交叉法测量菌落直径,重复 3 次,按(1)式计算抑制率。

浮液等体积混合,取一滴滴加在表面用火棉胶处理过的盖玻片上,使液滴倒悬在保湿小环境中,每处理重复 3 次。25℃ 下培养 8~10 h 后检查对照孢子的萌发。当对照孢子的萌发率达到 85% 以上后,检查各处理的萌发率(以孢子芽管长度大于孢子短半径者为萌发),试验重复 3 次,按(2)式计算孢子萌发抑制率。

供试菌株发酵液,24 h 后将小麦白粉病菌的孢子悬浮液喷洒于小麦叶片上。每处理 4 次重复,以清水为对照。7 d 后按小麦白粉病病害分级标准进行病情调查,并按(3)、(4)式计算病情指数和防治效果,试验重复两次。

②治疗作用测定:先在保湿条件下将小麦白粉病菌的孢子悬浮液喷洒于小麦叶片上,24 h 后在植株上喷施供试菌株发酵液。每处理设 4 次重复,以清水为对照。7 d 后按小麦白粉病病害分级标准进行病情调查并计算病情指数和防治效果^[16,17]。试验重复两次。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病级叶数} \times \text{代表级数})}{\text{叶数总数} \times \text{最高代表级值}} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{防治效果}(\%) = \frac{\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}}{\text{对照组病情指数}} \times 100 \quad (4)$$

2 结果与分析

2.1 稀有放线菌选择性分离方法的优化

不同稀释倍数对土壤稀有放线菌的分离效果见表 1。稀释 10 倍时,分离皿中真菌和细菌量很大,污染速度快、面积大,无法进行稀有放线菌的

分离;稀释 100 倍的分离皿中真菌和细菌数量大大减少,放线菌菌落数量较多,可以有效实现稀有放线菌的分离;稀释 1 000、10 000 倍的分离皿中放线菌菌落数量大大减少,分离效率降低。因此,土壤样品稀释 100 倍有利于稀有放线菌的分离。

Table 1 The isolation effects of rare actinomycete from soil under different dilution times

Type of microorganism	Dilution times			
	10	100	1 000	10 000
Fungus	++	+	+	+
Bacteria	+++	++	++	+
Streptomycetes	++	+++	++	+
Rare actinomycete	*	++	+	-

Notes “+”: 1~5 colonies/plate; “++”: 5~20 colonies/plate; “+++”: >20 colonies/plate; “-”: no colony; “*”: can't detect any rare actinomycetes before the whole dish be polluted by the rapid grown fungi and bacteria

不同抑制剂处理对土壤杂菌的抑制作用见表 2。可以看出,重铬酸钾可以很好地抑制真菌污染、较好地抑制细菌污染;培养基中添加抑制剂萘啶酮酸和卡那霉素均能较好地抑制细菌和部分链霉菌;同时添加萘啶酮酸和卡那霉素,则每皿分离到的放线菌菌落为 1~10 个,真菌和细菌污染率

很小,可以顺利进行挑菌工作;而抑制剂中利福平抑制作用太强烈,只有极少量放线菌能够被分离,因而认为利福平不宜用于放线菌的分离。因此,稀有放线菌选择性分离的最佳抑制剂为 2×10^{-5} g/mL 重铬酸钾 + 2×10^{-5} g/mL 萘啶酮酸 + 1×10^{-5} g/mL 卡那霉素。

Table 2 The inhibitive action of different inhibitors to non-target microbe

Type of Microorganism	Inhibitor					
	CK	PD	PD + NA	PD + K	PD + R	PD + NA + K
Fungus	++	+	+	+	-	-
Bacteria	+++	++	++	++	-	+
Streptomycetes	++	+++	++	++	-	+
Rare actinomycete	-	+	+	+	-	++

Notes “PD”: potassium dichromate; “NA”: nalidixic acid; “K”: kanamycin; “R”: rifampicin. The concentration of PD and NA are both 2×10^{-5} g/mL, 1×10^{-5} g/mL and 0.5×10^{-5} g/mL of K and R respectively. “+”: 1~5 colonies/plate; “++”: 5~20 colonies/plate; “+++”: >20 colonies/plate; “-”: no colony.

不同培养基上放线菌的分离结果见表 3。在改进的 HV 培养基上共分离到 8 属放线菌,以稀有放线菌分离比例最高,且种类较丰富。本研究中将原 HV 培养基中黑色的腐殖酸替换为当量的淀粉、硝酸钾,避免了不易辨认和挑菌的困难。从结果来看,可以认为改进的 HV 培养基对稀有放线菌

的分离效果良好。

2.2 稀有放线菌及其抗菌活性的筛选结果

对来源于安徽、浙江、山东、陕西四省的 31 份土壤样品,通过选择性分离,共得到 417 株放线菌,分别隶属链霉菌属、小单孢菌属、马杜拉菌属、诺卡氏菌属、链孢囊菌属、小双孢菌属、糖多孢菌

Table 3 Isolation result of actinomycetes on 3 different culture medium

Genus	Culture medium		
	Improved HV	Improved benet	Gk-A sp
Streptomycetes	+++	++++	++++
Micromonospora	++++	++	+++
Actinomyces	+	-	+
Nocardia	++++	++	++
Streptosporangium	++	+	-
Actinoplanes	+	-	-
Microbiospora	+	-	-
Saccharopolyspora	-	+	-
Total	7	4	4

Notes "+": 1~5 strains "++": 5~20 strains "+++": 20~50 strains "++++": >50 strains "-": none

属和游动放线菌等 8 属。以小麦根腐病菌、玉米大斑病菌和烟草赤星病菌等植物病原真菌和枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌等细菌为指示菌, 筛选出抗菌活性较强的 H32、H75、H223、H227 和 H238 等 5 株放线菌。

2.3 对病原真菌的抑制作用

H32、H75、H223、H227 和 H238 等 5 株放线菌发酵液对小麦根腐病菌、玉米大斑病菌和烟草赤星病菌 3 种供试病原真菌菌丝生长的抑制作用结果见表 4。

Table 4 Activities of fermentation of 5 strains against the mycelium growth of 3 plant pathogenic fungi

Plant pathogenic fungi	Strains	Linear regress equation	Correlation coefficient (R)	EC ₅₀ / (mL/L)	95% Confident limit / (mL/L)
Bipolaris sorokiniana	H32	$y = 3.3200 + 1.5846x$	0.9908	11.49	7.48~17.64
	H75	$y = 3.1402 + 1.5180x$	0.9983	16.79	11.72~24.05
	H223	$y = 3.6268 + 1.4172x$	0.9963	9.27	5.45~15.77
	H227	$y = 3.3432 + 1.5913x$	0.9915	10.93	7.05~16.95
	H238	$y = 3.5056 + 1.5792x$	0.9941	8.79	5.29~14.62
Exserohilum turcicum	H32	$y = 3.2568 + 1.5535x$	0.9953	13.24	8.90~19.73
	H75	$y = 3.0909 + 1.6267x$	0.9839	14.82	10.34~21.24
	H223	$y = 3.6973 + 1.3060x$	0.9930	9.94	8.89~20.41
	H227	$y = 3.3515 + 1.4668x$	0.9957	13.46	26.10~60.93
	H238	$y = 3.6408 + 1.4685x$	0.9954	9.28	5.43~15.87
Alternaria alternata	H32	$y = 3.3031 + 1.5309x$	0.9937	12.75	8.45~19.26
	H75	$y = 3.2932 + 1.6160x$	0.9880	11.80	7.76~17.94
	H223	$y = 3.6939 + 1.3487x$	0.9953	9.54	5.51~16.54
	H227	$y = 3.1542 + 1.6472x$	0.9940	13.11	8.93~19.24
	H238	$y = 3.6319 + 1.4309x$	0.9954	9.81	5.81~16.59

由表 4 可知, 5 株放线菌菌株发酵液对供试病原菌菌丝生长抑制作用显著, 其中 H223 和 H238 活性最强, 对 3 种供试病原菌的 EC₅₀ 值均小于 10 mL/L。

所筛选的 5 株放线菌发酵液对玉米大斑病菌、烟草赤星病菌和小麦根腐病菌孢子萌发的抑制作用测定结果见表 5。可以看出, 5 株放线菌发酵液对供试的 3 种植物病原真菌的孢子萌发也有明显的抑制作用, 其中以 H32 菌株的抑制作用更为显

著, 其发酵液对 3 种病原真菌孢子萌发的 EC₅₀ 值均小于 30 mL/L。

2.4 抑制细菌生长作用

以枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌为对象, 测试了 5 株放线菌发酵液的抗菌活性, 结果见表 6。5 株放线菌发酵液对 3 种供试细菌均有较好的抑制作用, 其中 H223 菌株活性最强, 其发酵液对 3 种细菌的抑菌圈直径均大于 30 mm。

Table 5 Activities of fermentation products of 5 strains against spore germination of 3 plant pathogenic fungi

Pathogenic bacteria	Strains	Linear regress	R	EC ₅₀	95% Confident limit
		equation		/(mL/L)	(mL/L)
Bipolaris sorokiniana	H32	$y = 3.5429 + 1.0358x$	0.9983	25.52	12.88~50.56
	H75	$y = 2.7294 + 1.3794x$	0.9888	44.26	28.63~68.41
	H223	$y = 3.2738 + 1.1129x$	0.9919	35.56	20.31~62.28
	H227	$y = 2.7768 + 1.3466x$	0.9752	44.77	28.83~69.51
	H238	$y = 3.2668 + 1.0967x$	0.9265	38.05	21.92~66.06
Exserohilum turcicum	H32	$y = 2.9541 + 1.2628x$	0.9601	28.93	16.60~50.43
	H75	$y = 3.6456 + 1.2595x$	0.9941	42.11	26.17~67.77
	H223	$y = 3.1088 + 1.1905x$	0.9843	40.71	23.90~69.34
	H227	$y = 3.2155 + 1.1086x$	0.9880	33.63	17.13~66.02
	H238	$y = 2.6855 + 1.3013x$	0.9892	60.06	39.79~90.66
Alternaria alternata	H32	$y = 3.3090 + 1.1479x$	0.9980	29.93	16.48~53.63
	H75	$y = 2.5428 + 1.4701x$	0.9914	46.93	31.29~70.38
	H223	$y = 2.8225 + 1.3305x$	0.9959	43.31	27.62~67.91
	H227	$y = 3.0968 + 1.2039x$	0.9824	38.09	22.84~63.52
	H238	$y = 2.7521 + 1.2822x$	0.9232	56.64	37.08~86.50

Table 6 Activities of fermentation products of 5 strains against 3 pathogenic bacteria

Pathogenic bacteria	Inhibitive diameter \approx /mm				
	H32	H75	H223	H227	H238
Bacillus subtilis	31.2(+++)	32.3(+++)	30.8(+++)	30.5(+++)	30.7(+++)
Escherichia coli	23.5(++)	27.3(++)	30.4(++)	27.8(++)	25.9(++)
Staphylococcus aureus	21.8(++)	25.7(+++)	31.6(+++)	27.8(++)	28.4(+++)

Notes “++”, the inhibitive circle showed middle diaphaneity; “+++”, the inhibitive circle showed high diaphaneity.

2.5 菌株发酵液盆栽防治小麦白粉病的效果

结果(表7)表明,5株放线菌发酵原液对小麦

白粉病的保护效果为73.45%~82.35%,治疗效果为67.74%~70.8%。

Table 7 Efficacy of fermentation products of 5 strains against *Blumeria graminis*

Strains	Protective efficacy		Therapeutic efficacy	
	Disease index	Control efficacy(%)	Disease index	Control efficacy(%)
H32	19.44	75.01	25.69	69.28
H75	19.66	74.72	25.93	69.00
H223	20.65	73.45	26.50	68.31
H227	18.75	75.90	26.98	67.74
H238	13.73	82.35	24.44	70.8
CK	77.78		83.63	

3 讨论

天然产物药物开发中,微生物药物开发是最热门也最重要的领域之一^[18]。研究认为,微生物的选择性分离主要基于两个途径:一是营养选择,即利用营养合适的培养基以促进目标菌的生长,二是选择性抑制,即通过添加抑制剂而抑制非目

标菌的生长^[19]。Stevenson认为,对于微生物培养,一个重要策略就是要求能保持相当长时间(30d以上)的培养^[20]。针对相对生长缓慢的稀有放线菌,由于细菌、真菌以及常规链霉菌的生长速度相对较快,要有效地分离到稀有放线菌,一个重要的问题就是如何减少这些非目标杂菌的污染。此外,土样保存条件(温度等)、预处理方式、

稀释倍数等对放线菌的分离均有影响^[20]。

李文均等曾报道了对几种主要稀有放线菌针对性很强的特定选择性分离方法^[4];而本研究希望找到一种比较简单但能分离得到种类较多稀有放线菌的方法,以便于进一步筛选农用抗生素。研究表明,以改进的 HV 培养基为分离培养基,土壤样品稀释 100 倍,添加 2×10^{-5} g/mL 重铬酸钾 + 2×10^{-5} g/mL 萘啶酮酸 + 1×10^{-5} g/mL 卡那霉素,在此条件下分离稀有放线菌是比较成功的,得到了小单孢属等 6 个属的稀有放线菌;并从分离到的 417 株放线菌中,发现了 5 株对供试病原真菌和细菌均有较强抑制作用的稀有放线菌,尽管其抗菌活性成分及其具体分类还需进一步研究。当然,研究也证明,当一种选择性的分离方法发展起来并被广泛应用时,一些种属,如马杜拉菌属、游动放线菌属、小单孢菌属、小四孢菌属等可能根本已算不上“稀有”,而是会在很多土壤样品中被分离得到^[21]。所以,发展这些高效选择性分离方法在稀有放线菌资源研究中具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] LU Zh-heng(刘志恒). Modern Microbiology(现代微生物学)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2002
- [2] LU Zh-heng(刘志恒), JIANG Cheng-lin(姜成林). Modern Biology & Technology of Actinomycetes(放线菌现代生物学与生物技术)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 2004.
- [3] YANG Yu-rong(杨宇容), XU Li-hua(徐丽华), DUAN Ruoling(段若玲), et al 稀有放线菌分离方法的研究[J]. J Yunnan Univ(云南大学学报), 1997, 19(4): 403-408.
- [4] LIW en-jun(李文均), ZHANG Zhong-ze(张忠泽), JIANG Cheng-lin(姜成林). 几种主要稀有放线菌的选择性分离[J]. World Notes on Antibiotic(国外医药抗生素分册), 2002, 23(1): 18-22.
- [5] JIANG Yi(姜怡), DUAN Shu-rong(段淑荣), TANG Shu-kun(唐蜀昆), et al 稀有放线菌分离方法[J]. Microbiol(微生物学通报), 2006, 33(1): 181-183.
- [6] ZHANG Xue-wu(张学武), ZHANG Jian-li(张建丽). 稀有放线菌的选择性分离[J]. Life Sci Instru(生命科学仪器), 2006, 6(3): 17-20.
- [7] LIW J SCHUMANN P, ZHANG Y Q, et al Proposal of Yania ceae fam. nov. and Yania flava sp. nov. and Emended Description of the Genus Yania[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(5): 1933-1938.
- [8] CU IX L, MAO P H, ZENG M, et al. Streptino spor a salina gen. nov., sp. nov., a New Member of the Family Nocardiopsaceae[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(2): 357-363.
- [9] LIM G, LIW J XU P, et al Nocardiopsis xinjiangensis sp. nov., a Halophilic Actinomycete Isolated from a Saline Soil Sample in China[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(1): 317-321.
- [10] LIW J XU P, TANG S K, et al Prauserella halophila sp. nov. and Prauserella alba sp. nov., Two New Moderately Halophilic Actinomycetes Isolated From the Saline Soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(5): 1545-1549.
- [11] XU P, LIW J TANG S K, et al Nocardiopsis polyresistens sp. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(4): 1465-1470.
- [12] XU P, LIW J TANG S K, et al Naxibacter alkaliblerans gen. nov., sp. nov., a Novel Member of the Family Oxalobacteraceae Isolated from China[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(3): 1149-1153.
- [13] LIW J TANG S K, Stäckebrandt E, et al Saccharomonospora paurometabolica sp. nov., a Moderately Halophilic Actinomycete Isolated From soil in China[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2003, 53(5): 1591-1594.
- [14] STEFANO D, PAOLO M, ROSA A, et al Microbial Technologies for the Discovery of Novel Bioactive Metabolites[J]. J Biotechnol, 2002, 99: 187-198.
- [15] OTOGURO M, HAYAKAWA M, YAMAZAKI T, et al An Integrated Method for the Enrichment and Selective Isolation of Actinokineospora spp. in Soil and Plant Litter[J]. J Appl Microbiol, 2001, 91: 118-130.
- [16] MU Li-yi(慕立义), WU Wen-jun(吴文君), WANG Kai-yun(王开运). Research Methods on Plants Chemical Protection(植物化学保护研究方法)[M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1997.
- [17] WU Wen-jun(吴文君). Technology Guidance on Plant Protection Chemical Experiments(植物化学保护实验技术指导)[M]. Xi'an(西安): Shaanxi Science and Technology Press(陕西科学与技术出版社), 1998.
- [18] LI Yi-qing(李一青), JIANG Cheng-lin(姜成林). 日本微生物药物开发动态[J]. World Notes on Antibiotics(国外医药抗生素分册), 2000, 21(4): 160-162.
- [19] HIRSCH C F, CHRISTENSEN D L. Novel Method for Selective Isolation of Actinomycetes[J]. Appl Environ Microbiol, 1983, 46(3): 925-929.
- [20] STEVENSON B S, EICHORST S A, WERTZ J T, et al New Strategies for Cultivation and Detection of Previously Uncultured Microbes[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 4748-4755.
- [21] TAKAHASHI Y, Omura S. Isolation of New Actinomycete Strains for the Screening of New Bioactive Compounds[J]. J Gen Appl Microbiol, 2003, 49: 141-154.

(Ed. JIN SH)