

# 土壤放线菌分离杂菌抑制方法研究

康萍芝<sup>1</sup>, 吴秀红<sup>2</sup>, 张丽荣<sup>1</sup>

(1. 宁夏农林科学院 植物保护研究所, 宁夏植物病虫害防治重点实验室, 宁夏 银川 750002;

2. 宁夏同心县林业局, 宁夏 同心 751300)

**摘要:**采用平板涂布法研究了土样不同预处理方法、杂菌抑制剂种类对土壤放线菌分离效果的影响。结果表明:风干处理(7~10 d)土样,放线菌的分离效果优于热处理(120℃×1 h),所分离到的放线菌数量和种类较多,且易于纯化,杂菌(细菌、真菌)明显减少,而供试土样经 120℃热处理 1 h 几乎未分离出放线菌,细菌数量仍较多,真菌全部被杀死;通过对 4 种杂菌抑制剂及其组合反复试验,选择出了土壤放线菌分离与纯化适宜的杂菌抑制剂种类(S+Q)和最佳用量,山梨酸钾(S)、氨苄西林钠(Q)在 GA 中的最佳使用剂量分别为 30、3 mg/L,而重铬酸钾(Z)及其组合 Z+Q 对土壤细菌、真菌也有一定的抑制作用,但抑菌效果比 S+Q 差,且放线菌的分离数量也较低。因此,进行风干处理土样和向放线菌分离培养基(GA)中加入杂菌抑制剂 S+Q 双重处理,可得到土壤放线菌分离与纯化较佳的效果。

**关键词:**土壤放线菌;分离;杂菌;抑制方法

**中图分类号:**S 606+.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)24-0167-04

放线菌(*Actinomycete*)是一类具有巨大实用价值的微生物资源,大多数种类的放线菌可产生抗菌物质,降解病菌细胞壁和酶。目前从微生物中发现的大约 8 000 种生物活性物质中,近 70%是由放线菌产生的<sup>[1]</sup>。利用放线菌的次生代谢产物抗生素制备的新农药,由于具有无污染、无残留、可再生、不产生抗药性、易于产业化、成本低等特点已成为无公害农药的主体和未来农药的发展方向。迄今,在工业、医学和农业上都有许多利用抗生素的成功实例,但就其数量、质量和品种而言还远远不能满足生产发展的要求,因此,放线菌资源的收集、开发和利用仍然是当前和今后研究的重要课题。土壤是放线菌生长的良好环境,自然界中放线菌资源极为丰富。然而,目前人们分离到的放线菌仅占土壤中所有放线菌的 10%左右<sup>[2]</sup>。开展大规模放线菌资源调查和建立有效的放线菌分离方法是发现放线菌新种属和新活性物质产生菌的重要途径之一<sup>[3]</sup>,也是一项长期而繁重的工作,因而,选择适宜的放线菌分离培养基、杂菌抑制剂等分离方法非常重要。

有关土壤放线菌分离杂菌抑制方法,大多以风干处

理或热处理土样,结合重铬酸钾( $K_2Cr_2O_7$ )杂菌抑制剂进行放线菌分离的报道较多<sup>[3-4]</sup>,但对于利用山梨酸钾等防腐剂作为放线菌分离的杂菌抑制剂的研究报道尚鲜见。该试验主要研究了土样不同预处理方法、杂菌抑制剂种类对土壤放线菌分离与纯化效果的影响,旨在寻找更加适宜的土壤放线菌分离方法,为放线菌资源的研究提供有利的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试土壤样品分别采集于宁夏中宁、惠农、平罗、贺兰、青铜峡、吴忠、同心等市县不同设施蔬菜根部土壤,共计 62 份。

重铬酸钾(含量≥99.8%,天津市瑞金特化学品有限公司)、氨苄西林钠(哈药集团制药总厂)、山梨酸钾(含量≥98.0%,王龙集团有限公司)、丙酸钙(含量≥99.0%,姜堰市味香源食品添加剂有限公司)。

土壤放线菌分离选用改良高氏 1 号培养基(GA),具体配方:可溶性淀粉(20 g)、 $KNO_3$ (1 g)、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (0.5 g)、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.5 g)、NaCl(0.5 g)、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.01 g)、琼脂(20 g)、pH 7.4~7.6、水 1 000 mL。

试验设备包括立式电热蒸汽压力灭菌锅、灭菌箱、空气浴培养摇床、超净工作台、生化培养箱等。

### 1.2 试验方法

1.2.1 土壤样品预处理 将土壤样品分别进行风干处理

**第一作者简介:**康萍芝(1972-),女,本科,研究员,现主要从事土壤微生物多样性和植物病害生物防治等研究工作。E-mail: kangpingzhi@163.com.

**基金项目:**宁夏自然科学基金资助项目(NZ13110)。

**收稿日期:**2015-07-27

(7~10 d)和热处理(将土样 120℃ 条件下热处理 1 h)<sup>[5-6]</sup>, 比较不同处理条件下放线菌的培养、分离效果,以减少真菌、细菌等非目的菌的数量,增加目的放线菌的数量<sup>[7]</sup>。

1.2.2 放线菌分离方法 土样的稀释:称取 10 g 土壤样品,加入装有 100 mL 灭菌水的 250 mL 三角瓶中,制成 10 倍稀释液,放入 25℃、160 r/min 的摇床上震荡 15 min 后取出,取其上清液依次制成  $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  倍的稀释液。杂菌抑制剂种类及其最佳用量选择:分别选用重铬酸钾(Z)、氨苄西林钠(Q)、山梨酸钾(S)、丙酸钙(C) 4 种杂菌抑制剂及其组合分别进行放线菌分离抑菌效果测定,以选择出防止放线菌污染效果较佳的杂菌抑制剂种类,并筛选出最佳使用剂量。放线菌的分离:采用平板涂布法进行分离。先将适量的杂菌抑制剂与冷却至 45℃ 的改良高氏 1 号培养基均匀混合,制成高氏 1 号培养基混合平板,然后取 0.2 mL 土壤稀释悬液加入到已

凝固的混合平板上,用玻璃涂沫棒涂布均匀,置于 28℃ 恒温培养箱内培养 5~7 d,观察放线菌的出现情况,并将其挑出反复纯化培养后,将单菌落转入斜面,4℃ 条件下保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同预处理方法对土壤放线菌分离数量的影响

从表 1 可以看出,风干处理放线菌的分离效果优于热处理。120℃ 条件下热处理 1 h 土样在常规的稀释浓度下几乎未分离出放线菌,但分离到许多细菌,说明热处理对细菌数量影响不明显,真菌全部被杀死;而风干处理所分离出的放线菌的数量  $2.7 \times 10^4 \sim 7.7 \times 10^4$  个/mL,其中 S 处理土样分离出放线菌的数量最多,高达  $7.7 \times 10^4$  个/mL,且观察到单个放线菌菌落较多、较大,易于纯化,细菌干扰数量也比热处理少,真菌数量几乎为零。

表 1 不同预处理方法对土壤放线菌分离数量的影响

Table 1 The influence of different pretreatment ways on soil actinomycetes isolation number

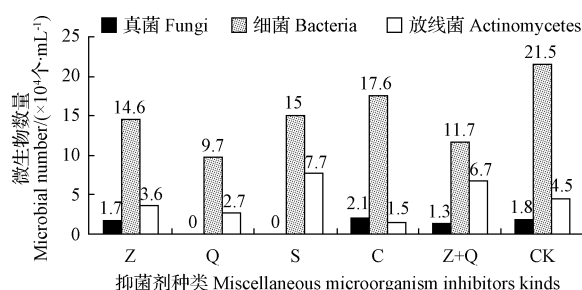
杂菌抑制剂种类 Miscellaneous microorganism inhibitors kinds	风干 7~10 d Air drying 7-10 days			120℃ 热处理 1 h 120℃ heat treatment 1 hour		
	真菌 Fungi	细菌 Bacteria	放线菌 Actinomycetes	真菌 Fungi	细菌 Bacteria	放线菌 Actinomycetes
	/( $\times 10^4$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ )	/( $\times 10^4$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ )	/( $\times 10^4$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ )	/( $\times 10^4$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ )	/( $\times 10^4$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ )	/( $\times 10^4$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ )
Q ampicillin sodium	0	9.7	2.7	0	6.0	0
S potassium sorbate	0	15	7.7	0	60.7	0.3
Z+Q potassium dichromate+ampicillin sodium	1.3	11.7	6.7	0	37.3	0
CK	1.8	21.5	4.5	0	41.3	0

注:杂菌抑制剂种类及浓度,1%氨苄西林钠(Q);1%山梨酸钾(S);0.007 5%重铬酸钾(Z)+0.005%氨苄西林钠(Q)。

Note:Kinds and concentration of miscellaneous microorganism inhibitors,1% ampicillin sodium(Q);1% potassium sorbate(S);0.007 5% Potassium dichromate(Z)+0.005% ampicillin sodium(Q).

### 2.2 不同杂菌抑制剂对土壤放线菌分离数量的影响

2.2.1 杂菌抑制剂种类的选择 分别选择 Z、Q、S、C 共 4 种杂菌抑制剂及其组合进行放线菌分离效果测定,以选择出防止放线菌污染效果较佳的杂菌抑制剂种类。根据相关资料和预试验结果,选择不同杂菌抑制剂的用量进行初筛试验。从图 1 可以看出,S 抑制剂对杂菌的抑制效果相对显著,放线菌的分离数量最高,达  $9.7 \times 10^4$  个/mL,尤其减少了真菌污染(真菌数量为 0),与对照(CK)相比较对细菌也有一定的抑制作用,细菌降低数量为  $6.5 \times 10^4$  个/mL;Q 抑制剂主要对细菌的抑制效果较明显( $9.7 \times 10^4$  个/mL),但在试验中观察到,土壤微生物菌落出现较迟,且生长缓慢,可能由于加入 Q 抑制剂浓度过大造成;C 抑制剂对 2 种杂菌(真菌、细菌)的抑制效果均较差,因为真菌、细菌的分离数值较高,分别为  $2.1 \times 10^4$ 、 $17.6 \times 10^4$  个/mL,而放线菌的分离数量最低( $1.5 \times 10^4$  个/mL);Z+Q 对杂菌的抑制效果相对也较好,但对放线菌的分离数量低于 S 抑制剂。总体来讲,加入不同杂菌抑制剂后,绝大多数处理细菌、真菌污染低于空白对照,尤其 S、Z+Q 抑制剂的抑菌效果相对较好。



注:杂菌抑制剂种类及浓度,0.225 mg/L 重铬酸钾(Z);1%氨苄西林钠(Q);1%山梨酸钾(S);1%丙酸钙(C);0.225 mg/L Z+0.15 mg/L Q。

Note:Kinds and concentration of miscellaneous microorganism inhibitors,0.225 mg/L potassium dichromate(Z);1% ampicillin sodium(Q);1% potassium sorbate(S);1% calcium propionate(C);0.225 mg/L potassium dichromate (Z)+0.15 mg/L ampicillin sodium(Q).

图 1 不同杂菌抑制剂对土壤放线菌分离数量的影响

Fig. 1 The influence of different miscellaneous microorganism inhibitors on soil actinomycetes isolation number

2.2.2 不同杂菌抑制剂组合及用量的进一步筛选 由图 1 可知,取长补短重新组合抑菌剂及调整用量进一步筛选。从表 2 可以看出,S+Q 抑制剂对细菌和真菌的

抑制效果最好,且放线菌的分离数量高达  $15.6 \times 10^4$  个/mL;而 Z+Q、S+Q+Z 抑制剂由于 Z 的浓度增加抑制了所有土壤微生物的生长,放线菌的分离数量也

极低;S+Z 抑制剂对细菌的抑菌效果较差,放线菌的分离数量也较低。因此,S+Q 抑制剂是防止放线菌污染效果较佳的杂菌抑制剂组合。

表 2 不同杂菌抑制剂组合及用量选择试验

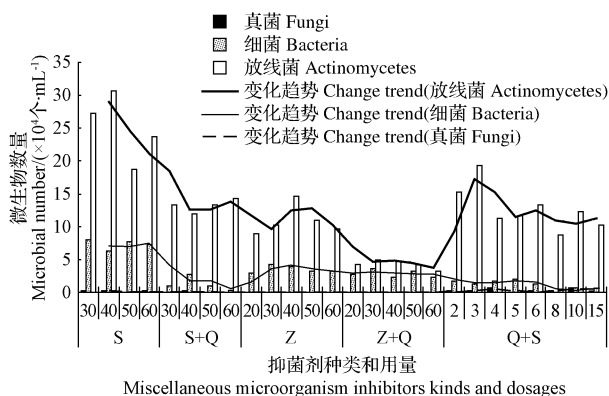
Table 2 The selection experiment of different miscellaneous microorganism inhibitor combinations and dosages

杂菌抑制剂种类 Miscellaneous microorganism inhibitors kinds	浓度及用量比 Concentration and dosage ratio	真菌 Fungi /( $\times 10^4$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ )	细菌 Bacteria /( $\times 10^4$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ )	放线菌 Actinomycetes /( $\times 10^4$ 个 $\cdot$ mL $^{-1}$ )
S+Z potassium sorbate+potassium dichromate	1%+0.225 mg/L(3:2)	0	9.0	3.0
S+Q potassium sorbate+ampicillin sodium	1%+0.15% (3:2)	0	1.3	15.6
Z+Q potassium dichromate+ampicillin sodium	3.75%+0.15% (1:1)	0	2.4	1.0
S+Q+Z potassium sorbate+ampicillin sodium+potassium dichromate	1%+0.15%+3.75%(3:5:3)	0	0.3	0.7
CK	—	2.2	15.4	6.8

2.2.3 不同杂菌抑制剂及其组合最佳用量选择 同等条件下分别同时利用不同杂菌抑制剂及其用量处理土壤样品分离放线菌,培养 7 d 进行观察。从图 2 可以看出,①S 抑制剂最佳用量的确定:用 S 处理的土壤中分离到的放线菌数量比 S+Q 相对多,但在试验中观察到,细菌数量和小菌落相应也多,不利于放线菌的纯化,而处理 S+Q 中加入 Q 后,虽然分离到的放线菌数量有所下降,但单菌落明显、较多,生长速度也快,利于放线菌纯化,2 种处理对真菌的抑菌效果均显著,对细菌的抑菌效果 S+Q 明显优于 S;同时,随着 S 抑菌剂浓度的升高,S+Q 处理放线菌数量趋于增加,但随着浓度的增加,放线菌的种类趋于减少。综合考虑,处理 S+Q 是放线菌分离与纯化适宜的杂菌抑制剂种类,其 S 的最佳用量为 30 mg/L;②Z 抑制剂最佳用量的确定:在试验中观察到,加入 Z、Z+Q 杂菌抑制剂不同用量导致微生物数量

明显减少,菌落生长缓慢,放线菌种类单一,且分离数量也较低;加入 Q 后,放线菌的分离数量降低更加明显,说明处理 Z、Z+Q 及其浓度范围不适宜作为放线菌分离和纯化的杂菌抑制剂;③Q 抑制剂最佳用量的确定:随着 Q 用量的增加,细菌、真菌 2 种杂菌的数量均呈降低趋势,尤其对细菌数量影响较显著,放线菌的分离数量在缓慢下降。图 2 表明,3 mg/L 为抑菌剂 Q 加入的最佳用量。因此,综合上述试验结果,S+Q 是放线菌分离与纯化最适宜的杂菌抑制剂种类,其最佳用量为 30 mg/L+3 mg/L。

2.2.4 抑菌效果较优的杂菌抑制剂 S+Q 对放线菌分离结果验证 利用 11 个土样进行杂菌抑制剂 S+Q 及最佳用量结果验证。从图 3 可以看出,在不同土样的测定中,S+Q 杂菌抑制剂对细菌和真菌的抑制效果均较好,其分离数值均显著低于空白对照( $18.4 \times 10^4$ 、 $2.6 \times 10^4$  个/mL),而放线菌的分离数量均高于空白对照,为  $9.0 \times 10^4 \sim 41.0 \times 10^4$  个/mL,且在试验中观察到单个放线菌菌落较明显,利于放线菌的纯化。



注:杂菌抑制剂及其组合用量,S:30~60 mg/L,Q:3 mg/L;Z:20~60 mg/L,Q:3 mg/L;Q:2~15 mg/L,S:30 mg/L。

Note:Dosage of miscellaneous microorganism inhibitors and their combination,S:30—60 mg/L,Q:3 mg/L;Z:20—60 mg/L,Q:3 mg/L;Q:2—15 mg/L,S:30 mg/L。

图 2 S、Z、Q 3 种不同杂菌抑制剂及其组合最佳用量选择

Fig. 2 The optimal dosage choice of S, Z and Q miscellaneous microorganism inhibitors and their combinations

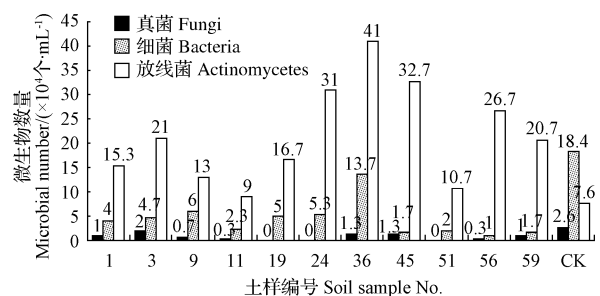


图 3 效果较优的杂菌抑制剂 S+Q 对土壤放线菌分离数量的影响

Fig. 3 The influence of the better miscellaneous microorganism inhibitors S+Q on soil actinomycetes isolation number

### 3 结论与讨论

该试验采用风干预处理土样,放线菌的分离效果优于热处理,所分离到的放线菌数量和种类较多,且单菌落多易于纯化,细菌、真菌等非目的菌(杂菌)明显减少,



而在 120℃ 条件下热处理土样 1 h 几乎未分离出放线菌,且对细菌数量影响不大,真菌全部被杀死<sup>[8-9]</sup>。选择 4 种杂菌抑制剂及其组合通过反复试验,选择出了土壤放线菌分离与纯化适宜的杂菌抑制剂种类(S+Q)和最佳使用量,山梨酸钾(S)、氨苄西林钠(Q)的最佳剂量分别为 30、3 mg/L。在试验测定中也发现,化学抑制剂重铬酸钾(Z)及其组合 Z+Q 对土壤细菌、真菌也有一定的抑制作用,但抑菌效果比 S+Q 相对较差,且放线菌的分离率也较低。该试验研究表明,通过对土壤样品进行风干预处理和向放线菌分离培养基(GA)中加入杂菌抑制剂(山梨酸钾 30 mg/L+氨苄西林钠 3 mg/L)进行双重处理,最有利于土壤放线菌的分离,能够分离出种类和数量较多的放线菌单菌落,从而易于其纯化。

该试验选用山梨酸钾防腐剂作为杂菌抑制剂,通过反复筛选和对比试验,寻找到了土壤放线菌分离与纯化效果较佳的杂菌抑制剂。据相关资料显示,山梨酸钾防腐剂对光、热稳定性强,无毒,对霉菌、酵母菌、好氧性细菌等微生物抑菌作用十分有效,具有独特的防霉、防腐性质,用量很少即可有效防止杂菌污染,且价格便宜<sup>[10]</sup>。若在山梨酸钾中再加入适量的对细菌具有较好抑制作用的氨苄西林钠<sup>[11-12]</sup>,能够得到较佳的抑菌效果。

## 参考文献

- [1] 杨守容,徐丽华,段若玲,等.稀有放线菌分离方法的研究[J].云南大学学报(自然科学版),1997,19(4):403-408.
- [2] 张纪忠,黄静娟,盛宗斗,等.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社,1985:214-218.
- [3] 司美茹,薛泉宏,来航线.放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究[J].微生物学通报,2004,31(2):61-65.
- [4] 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):280-284.
- [5] 史学群,宋海超,刘柱,等.海南省土壤拮抗放线菌分离方法初探[J].中国农学通报,2006,22(10):431-435.
- [6] 母连军,胡永松,王忠彦.放线菌分离方法的进展[J].四川食品工业科技,1996(3):4-6.
- [7] MANN J. Natural products as immunosuppressive agents[J]. Nat Prod Rep,2001(18):417-430.
- [8] 郑雅楠,杨宇,吕国忠,等.土壤放线菌分离方法研究[J].安徽农业科学,2006,34(6):1167-1168,1170.
- [9] 闫建芳,刘秋,刘志恒,等.瓜类枯萎病菌拮抗放线菌分离方法的研究[J].河南农业科学,2006(4):81-83.
- [10] 康萍芝,张丽荣,沈瑞清,等.不同防腐剂对马铃薯脱毒试管苗污染的控制效果[J].中国蔬菜,2012(2):93-96.
- [11] 康萍芝,张丽荣,沈瑞清,等.马铃薯脱毒试管苗污染控制效果研究[J].北方园艺,2011(20):134-136.
- [12] 方志明.加入抗生素培养基对马铃薯脱毒试管苗的影响[J].中国马铃薯,2001,15(2):92.

## Study on Inhabitation Methods to Miscellaneous Microorganism for Soil Actinomycetes Isolation

KANG Pingzhi<sup>1</sup>, WU Xiuhong<sup>2</sup>, ZHANG Lirong<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences/Ningxia Key Laboratory of Plant Disease and Insect Pest Control, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. Ningxia Tongxin County Forestry Bureau, Tongxin, Ningxia 751300)

**Abstract:** The influence of different pretreatment ways of the soil samples and miscellaneous microorganism inhibitors to the isolation effect of soil actinomycetes was studied by plate paint isolation method. The results showed that actinomycetes isolation effect of air drying (7—10 days) soil samples was better than that of heat treatment (120℃ × 1 hour). The number of actinomycetes isolated and kinds were more, and easily purified, and miscellaneous microorganism (bacteria, fungi) also decreased significantly. However, actinomycetes were hardly isolated in the soil samples that were treated with 120℃ × 1 hour, bacteria number was still more, fungi were all killed; by testing repeatedly four kinds of miscellaneous microorganism inhibitors and their combinations, suitable inhibitor(S+Q) and its optimal dosage of soil actinomycetes isolation and purification were selected out. The optimum dosages of potassium sorbate(S) and ampicillin sodium(Q) were 30 mg/L and 3 mg/L, respectively. Potassium dichromate (Z) and its combinations(Z+Q) also had certain inhibitory effect on soil bacteria and fungi, but their inhibitory effect were not as well as those of S+Q, and isolation number of actinomycetes also were lower. Therefore, through double dealing with air drying soil samples and adding S+Q in actinomycetes isolation medium(GA), better effect of soil actinomycetes isolation and purification were available.

**Keywords:** soil actinomycetes; isolation; miscellaneous microorganism; inhabitation methods