

土壤放线菌的分离及对红色毛癣菌拮抗作用研究

欧家成 张小波 张宇泽 陈科一 柴恭进 徐瑞亨 薛春景

丽江文化旅游学院 云南 丽江 674199

摘要:目的:探讨放线菌对红色毛癣菌的拮抗作用,为癣菌病的微生物防治提供参考。方法:采集土壤制得放线菌菌悬液,以滤纸片法和液体悬浮法分别测定抑菌直径与 MIC 值,对纯化的放线菌进行 16SrDNA 序列分析。结果:从丽江玉龙雪山腐质树下土、腐质草地土、干质草地土中各分离纯化培养出 TRFXJ-1, TRFXJ-2, TRFXJ-3, 通过抑菌圈和 MIC 双重验证,明确腐质树下土中提取的 TRFXJ-1 具有一定抑菌潜力;三个样本中的抑菌直径有统计差异 ($P < 0.05$)。结论:初步证实土壤放线菌对红色毛癣菌的拮抗作用,该结果可为皮肤癣病的微生物防治提供依据。

关键词:土壤放线菌;红色毛癣菌;抑菌效果;拮抗机制

红色毛癣菌是各种皮肤癣病最主要的致病菌。中医传统认为脚气是感受湿热毒邪形成的^[1]。对于足癣菌病的治疗有一种长久流传的说法,即脚气在土里走走就好了。现代微生物学解释为在干燥土壤行走的过程中,毛癣菌作为特化真菌,无法抵抗土壤内部环境中的放线菌;而放线菌在分化菌丝及产生孢子时,其次级代谢产物能够合成一些具有专一性功能的物质,抑制病原菌的生长、繁殖和侵染,从而达成消灭或抑制脚气的效果。目前,临床上常见的抗癣菌治疗结果表明大多药物生物毒性较大,副作用强。因此,研究新的癣菌微生物防治方法显得愈加重要。本研究通过分析土壤放线菌对癣菌的拮抗作用特点,筛选出具有抑菌作用的放线菌种,为癣菌病的微生物防治提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

1.1.1 实验材料

采集丽江玉龙雪山腐质树下土,腐质草地土,干质草地土,取三种土壤各 50g,为土壤样本 1、2、3。均采自土下 25cm 处,土壤 PH 值为 7.5-8.5。三类样品显微鉴定镜下可见多类放线菌。

1.1.2 实验菌株

红色毛癣菌 (SHBCCC (D) 82296) 来源于上海菌种保藏中心,土壤放线菌采自采集土壤样本。

1.2 实验方法

1.2.1 培养基及土壤预处理

每份样品土壤称取 2g,自然风干,加入装有 18mL 无菌水的三角瓶中,于 37℃、200r/min 摇床震荡

30min 制备成 3 种土壤混悬液。再进行 10 倍梯度稀释,稀释至 100 倍。吸取 0.2mL 稀释液涂布于高氏一号培养基上,将培养皿倒置于恒温培养箱中 28℃ 培养 72h,直至菌落形成。

1.2.2 土壤放线菌的分离纯化

显微镜观察到单个放线菌菌落后,接种环将菌落挑起,并使用平板划线法接种到培养皿,将平皿再次放入恒温培养箱培养。重复上述步骤,直至获得稳定的纯种放线菌。从 3 个土壤样本分离纯化菌种分别命名为 TRFXJ-1 (腐质树下土), TRFXJ-2 (腐质草地土) 和 TRFXJ-3 (干质草地土),进行基因测序。

1.2.3 16SrDNA 序列分析

用 PCR 扩增法对放线菌的 16SrDNA 进行扩增测定,提交至 NCBI 数据库进行比对,进行放线菌的鉴定和分类。使用 DNA StarLasergene 及 MEGA5.1 生物信息学软件对菌株基因组及 GenBank 中检索得到的其他基因组序列进行同源性分析并绘制系统进化树。

1.2.4 放线菌菌悬液的制备

在超净工作台分别刮取三种土壤放线菌接种于无菌水试管,摇匀后 37℃ 增菌;用紫外分光光度计调菌体浓度 10^2 CFU/ml,得到供试菌悬液。

1.2.5 滤纸片法测定抑菌活性

取直径为 6mm 的灭菌滤纸片,将滤纸片分别放入三种菌液及对照无菌水中浸泡待用。用 PDA 培养基融化后倒入培养皿,待冷却后用移液枪吸取红色毛癣菌菌悬液涂布于平皿,制成含菌平板。将三种带菌纸片和无菌对照纸片贴在平皿表面,每皿 3 片,37℃ 恒温培养 24h。

进行3次平行试验,用十字交叉法测定各组抑菌直径(R2)和指示菌菌落直径(R1),并根据(R1-R2)/R1的比值大小,筛选出抑菌活性强的放线菌菌株。

1.2.6 液体悬浮培养法测定最低抑制浓度(MIC)

分别取TRFXJ-1, TRFXJ-2和TRFXJ-3菌悬液加入高氏一号培养基定容,以定容后的菌液为第1支管,倍半稀释后获得10支菌液。分别接入红色毛癣菌菌悬液,混匀。以灭菌培养基作空白对照,仅接入红色毛癣菌的菌液作为阳性对照,仅接入土壤放线菌的菌液作为阴性对照,培养并观察培养液变浑浊为长出真菌,培养液澄清为无真菌长出。以供试菌能抑制生长的最低添加量为该提取物的最低抑菌浓度(MIC),进行3次平行试验。

1.3 统计方法

使用SPSS23.0软件进行抑菌活性和最低抑菌浓度数据分析,计量资料以均数±标准差表示,采用单因素方差分析,检验结果以 $P > 0.05$ 为无统计学差异。

2 结果

2.1 土壤放线菌的分离鉴定

从TRFXJ-1、TRFXJ-2、TRFXJ-3样本中分离培养

的细菌进行显微鉴定及纯化培养,结果如图1所示。各样本测得的16SrDNA序列在NCBI中在线BLAST比对分析,结果显示菌株属于链霉菌属放线菌,再从GenBank中获得和实验菌株序列相似的种属的16SrDNA序列22株,构建系统发育树,见图2。因该菌株与链霉菌属下面的种16SrDNA序列相似性均较小,因此无法鉴定到种。

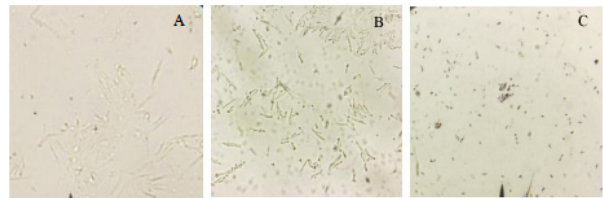


图1 不同土壤样本中放线菌的显微鉴定观察(100×)
注: A为TRFXJ-1, B为TRFXJ-2, C为TRFXJ-3。

2.2 土壤放线菌对红色毛癣菌的抑菌效果比较

通过滤纸片法测定抑菌圈,发现对红色毛癣菌具有不同程度的拮抗作用。TRFXJ-1、TRFXJ-2、TRFXJ-3的抑菌直径分别为 $10.38 \pm 1.28\text{mm}$ 、 $8.18 \pm 1.49\text{mm}$ 、 $6.64 \pm 0.32\text{mm}$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,TRFXJ-1对红色毛癣菌的抑菌效果相对较好,其平

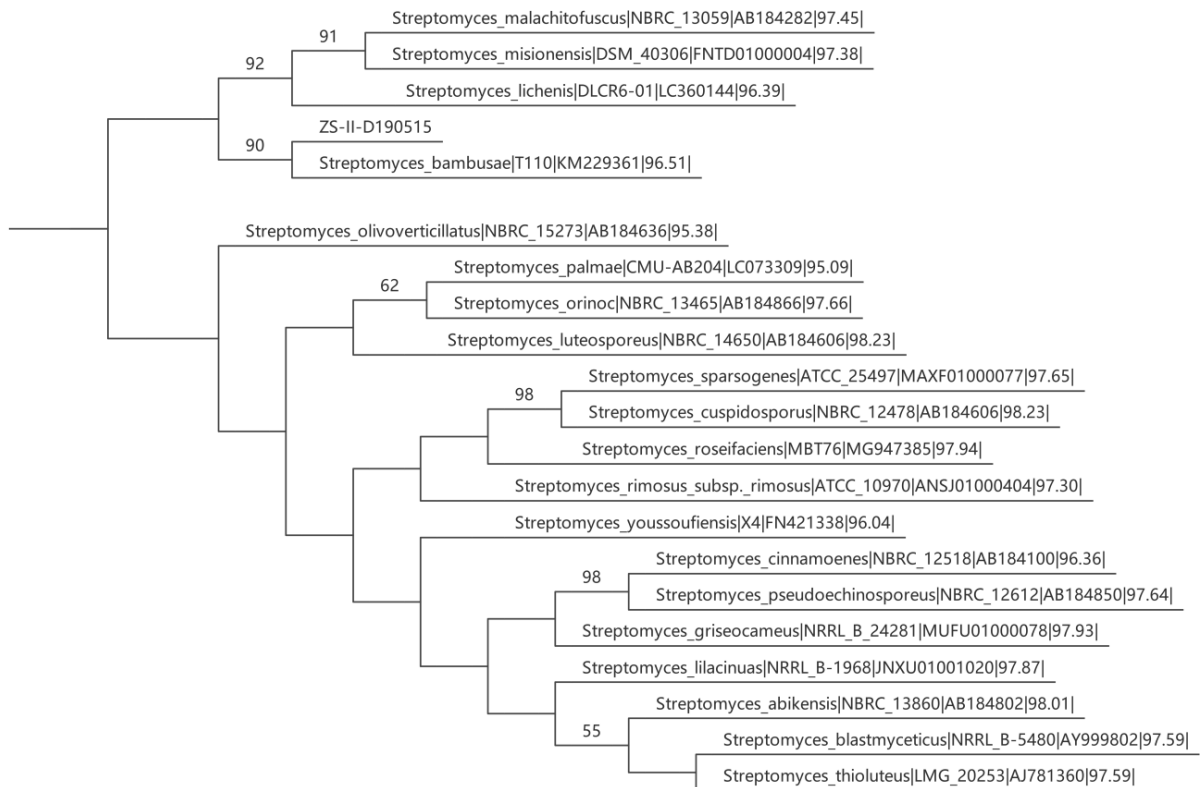


图2 不同土壤样本中放线菌的基因进化树分析

均抑菌直径在 10mm 以上。见表 1。

表 1 土壤放线菌对红色毛癣菌平均抑菌直径 (mm)

土壤样本	平均抑菌直径	F	P
TRFXJ-1	10.38±1.28		
TRFXJ-2	8.18±1.49	12.295	0.008*
TRFXJ-3	6.64±0.32		

注: * $P < 0.05$, 表示差异有显著意义。

2.3 土壤放线菌对红色毛癣菌的最低抑菌浓度比较

结果可知, 以土壤放线菌作为阴性对照, 空白对照并未有浑浊出现, 其中 TRFXJ-1 的 MIC 值为 $8.36 \pm 1.02 \text{mg/ml}$, TRFXJ-2 和 TRFXJ-3 样本中均未出现 MIC 范围, 且红色毛癣菌阳性对照管中有较明显沉淀及浑浊出现。不同供试菌种对红色毛癣菌的抑菌效果存在差异。

3 讨论

3.1 土壤放线菌的菌种分布及分离

目前, 世界上已发现的抗生素大约有 60% 是由放线菌产生。本研究自丽江玉龙雪山采集的 TRFXJ-1 经鉴定为链霉菌属, 从 GenBank 中获得和实验菌株序列相似的种属的 16SrDNA 序列 22 株, 与尖孢链霉菌的种相

似度最高达到 98.23%, 但其与稀疏链霉菌、孔雀石褐链霉菌、米修链霉菌。假刺孢链霉菌等种相似度均达到 97% 以上, 没有相似度达到 99% 以上的菌种, 需要更精确的 16SrDNA 分析鉴定, 并考虑多基因联合分析。

3.2 土壤放线菌对真菌的拮抗作用特点

土壤样本中分离纯化出的三种不同的放线菌均对红色毛癣菌表现出不同程度的抑菌活性, 但抑菌效果存在显著差异。在抑菌测试中 TRFXJ-1 菌株的抑菌圈直径最大, 表明其对红色毛癣菌的拮抗作用最为显著, 而 TRFXJ-2 和 TRFXJ-3 菌株的抑菌能力相对较弱。该结果可能由于不同放线菌菌株的代谢产物和抗菌机制不同所致。同时, 浓度测试过程中因不同菌种生长的最适温度不一致, 可能会对结果造成一定干扰。TRFXJ-1 菌株的 MIC 值最低, 说明其在较低浓度下即可对红色毛癣菌产生显著的抑制作用。土壤放线菌对红色毛癣菌的拮抗作用可能来源于所产生特定的抗菌肽或代谢产物, 对真菌的细胞壁进行直接攻击导致真菌菌丝消融现象, 其抑菌效果差异可能与它们的生物活性物质有关^[3]。本研究进一步证实了 TRFXJ-1 菌株在拮抗红色毛癣菌方面的潜力, 在微生物制药的开发和利用方面具有一定的开发前景。

参考文献:

- [1] 刘帅. 榆林市湖羊皮肤癣菌病流行病学调查与诊疗 [D]. 西北农林科技大学, 2022.
- [2] 吕雪莲. 中国体癣和股癣诊疗指南 (基层实践版 2022) [J]. 中国真菌学志, 2022, 17(03): 177-182.

- [3] Chaudhary H S, Yadav J, Shrivastava A R, et al. Antibacterial activity of actinomycetes isolated from different soil samples of Sheopur (A city of central India) [J]. Journal of advanced pharmaceutical technology & research, 2013, 4(2): 118.

基金项目:

此论文是基于 2023 年云南省大学生创新创业训练项目“土壤放线菌的分离及对红色毛癣菌拮抗作用研究” (sc202313328007) 的研究成果。