

海洋稀有放线菌的选择性分离方法

原野, 何山*

(宁波大学 海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 介绍了当前海洋稀有放线菌分离中对样品常用的预处理和富集技术、培养基及抑制剂的選擇方法以及高通量/原位富集培养技术, 指出了海洋稀有放线菌选择性分离方法的重点改进方向, 以进一步促进海洋难培养微生物资源的开发和利用。

关键词: 海洋稀有放线菌; 选择性分离; 高通量培养; 原位富集培养

中图分类号: Q939.13

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2014) 03-0012-06

放线菌是微生物活性天然产物的主要来源, 在迄今发现的 22 000 余种微生物来源活性化合物中, 约 45% 产生于放线菌, 尤其是链霉菌属^[1]。稀有放线菌(rare *Actinomycetes*)是指链霉菌属以外的放线菌, 用传统分离方法得到稀有放线菌概率比得到链霉菌要低很多^[2]。随着陆生放线菌中发现化合物的重复率日益增高, 近 20 a 来, 对海洋环境中稀有放线菌的研究, 逐渐成为天然产物研究领域的热点之一。

稀有放线菌广泛分布于海洋环境中^[3], 海洋环境和地理形态的多变性和特殊性, 造就了海洋中微生物的多样性^[4], 这些放线菌可以产生多种具有优良生物活性且结构新颖的化合物。但迄今分离得到的微生物尚不足自然界微生物总量的 1%, 表明数以百万计的微生物物种尚未被发现^[5]。海洋稀有放线菌的生长极易被细菌、真菌和链霉菌抑制, 较难获得纯培养, 因此如何有效地选择性分离是当务之急。

1 选择性分离方法

选择性分离方法包括对环境样品进行预处理与富集、培养基成分的改进、合适抑制剂的添加, 或有关的创新分离技术等。综合运用这些方法能显著地提高稀有放线菌的分离效果。

1.1 样品的预处理及富集

为了避免因地表径流引入的陆生放线菌对分离产生干扰, 样品采集应远离海岸^[6], 且沉积物取样要使用样品采集器或人工采集表层以下的样品。

从自然环境中采集的样品, 如不经预处理而直接培养, 细菌会严重污染真菌和放线菌分离培养基。放线菌是一类革兰氏阳性细菌, 主要以孢子形式萌发, 其孢子对外界刺激具有很强的耐受性, 适当的处理能刺激其孢子萌发。而一般细菌细胞壁相对较薄, 易发生质壁分离而失去生命力^[7]。因此, 利用放线菌孢子抗逆性强的特点, 在样品分离前进行适当的预处理, 可以达到较好的分离效果。

1.1.1 干燥及干/湿热处理

天然沉积物样品可采取自然风干、湿热(50 °C, 6 min)、干热(120 °C, 1 h)预处理方法, 结合 1.5% 的苯酚, 可有效地抑制细菌的生长并刺激稀有放线菌, 例如游动放线菌属(*Actinoplanes*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、小双孢菌属(*Microbispora*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)和野野村氏菌属(*Nonomuraea*)等分离^[8-9]。较其他稀有放线菌, 罕见的链孢囊菌属(*Streptosporangium*)因其孢子有承受和抵御外界物理或化学预处理的特性, 很难用传统的方法分离。因此对天然样品的干热处理(120 °C, 1 h)可显著诱导该属菌株的生长^[10]。

收稿日期: 2013-10-18.

宁波大学学报(理工版) 网址: <http://journal.lg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金(41306134)。

第一作者: 原野(1987-), 男, 陕西西安人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 海洋生物学. E-mail: 23yuanye@163.com

*通信作者: 何山(1982-), 男, 广东韶关人, 博士/副教授, 主要研究方向: 海洋微生物药物与生物技术. E-mail: heshan@nbu.edu.cn

1.1.2 苯酚处理

苯酚对细菌、真菌和链霉菌均有杀灭作用。因此,用1.5%的苯酚处理可去除或减少对其敏感的微生物^[11]。在国内外相关研究中,马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、小双孢菌属、小单孢菌属、诺卡氏菌属、野野村氏菌属、红球菌属(*Rhodococcus*)以及疣孢菌属(*Verrucosisspora*)等稀有放线菌属的分离均添加了1.5%苯酚^[12]。Istianto等^[13]采用1.5%苯酚预处理后,从泥土样品中分离得到的小单孢菌属、马杜拉放线菌属、小双孢菌属以及多形态孢菌属(*Polymorphospora*)总和多达75.4%。需要注意的是,通常处理后的苯酚要稀释以去除其毒性。

1.1.3 碳酸钠处理

经碳酸钠处理后的自然样品能分离出更多的稀有放线菌^[14],但其机理尚不明确。Tsao等^[15]报道了将自然样品与碳酸钙粉末混匀,样品pH的变化有利于放线菌生长,且钙离子能刺激放线菌气生菌丝的形成。Qin等^[16]用碳酸钙富集和再水化-离心法(Rehydration and Centrifugation, RC),首次从内生环境中分离得到糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、芽生球菌属(*Blastococcus*)、指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、厄氏菌属(*Oerskovia*)、珊瑚放线菌属(*Actinocorallia*)以及姜氏菌属(*Jiangella*)等稀有属放线菌。从土壤样品中分离稀有放线菌属时,碳酸钙处理与其他处理方法结合使用其效果更好^[17]。

1.1.4 微波辐射

Ferriss^[18]报道了对土壤进行微波辐射处理可以减少真菌和原核生物在土壤浸出液中的总量,且能显著地增加包括小单孢菌属、小多孢菌属(*Micropolyspora*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)以及马杜拉放线菌属等稀有放线菌在土壤样品中的数量^[19]。Bredholdt等^[20]用传统分离方法从挪威特隆赫姆峡湾450 m深处采集的海底沉积物中只分离到链霉菌属和小单孢菌属,经紫外线照射、超高频和极高频辐射预处理后再分离得到了11个不同的属。

1.1.5 差速离心

离心处理可去除链霉菌及其他非可动放线菌,从而有效分离可动放线菌^[21]。酶解和差速离心方法非常适用于从内生环境中分离包括假诺卡氏菌

属(*Pseudonocardia*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、小单孢菌属、拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、诺卡氏菌属、野野村氏菌属、马杜拉放线菌属、戈登氏菌属、原小单孢菌属和分枝杆菌属(*Mycobacterium*)等在内的稀有放线菌^[22]。Maldonado等^[23]报道了分散差速离心(Dispersion and Differential Centrifugation, DDC)方法较传统的震荡分离方法对底泥样品的分散效果更好。

1.1.6 趋化法

Palleroni^[24]利用游动孢子囊,特别是游动放线菌属的孢子囊能被Cl⁻和Br⁻吸引的特性,加入KCl缓冲液,在特殊设计的分离装置中选择分离得到该属放线菌。Hayakawa^[25]报道了包括游动放线菌属、指孢囊菌属及短链游动菌属(*Catenuloplanes*)在内的可以形成游动孢子的稀有放线菌,可以通过添加木糖、氯化物、溴化物、 γ -三甲基吡啶以及香草醛等趋化物分离得到。在分离草孢菌属(*Herbidospora*)、小双孢菌属、小四孢菌属(*Microtetraspora*)和链孢囊菌属等稀有放线菌时,可以通过氯胺处理^[26]。

与样品预处理不同,分离工作前对自然样品的富集处理的目的在于促进目标微生物的生长^[27]。Magarvey等^[28]将裁切为合适大小的纤维素纸放置于琼脂培养皿上,再将样品分散于纤维素纸的表面,以分离沉积物样品中生长缓慢的放线菌。Mincer等^[29]在沉积物样品中添加了卡那霉素、万古霉素、庆大霉素以及四环素,利用盐孢菌属(*Salinispora*)放线菌耐药性分离得到366株该属放线菌。

1.2 培养基及抑制剂的选择

选择合适的营养成分及添加量,从而接近微生物原始的自然生存环境,在稀有放线菌的分离培养中十分重要。Hayakawa等^[30]发明腐殖酸-维生素琼脂(HVA),是稀有放线菌分离的里程碑之一^[27]。该培养基中腐殖酸是唯一碳源和氮源,很适合从天然样品中分离稀有放线菌,而且黑色的腐殖酸培养基背景便于辨认和分离白色的放线菌菌落。

1.2.1 培养基成分选择

可溶性淀粉、甘油、葡萄糖等放线菌偏爱的碳源在放线菌分离中使用十分广泛,同时尝试非常见碳源,在稀有放线菌的分离探索中也是有益的。

彭云霞等^[31]用海藻糖、丙烯酰胺、EDTA 和吗啉丙磺酸作为碳源,分离得到的稀有放线菌总数均超过 50%。用格兰胶(gellan gum)代替琼脂作为培养基固化剂,可以提高微生物的可培养性^[32]。采用新颖的分离放线菌 Trap 技术,格兰胶培养基分离得到的稀有放线菌数量也大大超过琼脂培养基^[33]。在分离培养基中添加生长因子也是选择性分离的有效手段^[3],如各种放线菌生长所必需的维生素等。

1.2.2 抑制剂选择

许多稀有放线菌都对广谱抗生素有耐受性,因此在稀有放线菌的分离中常加入抗生素以抑制细菌和快速生长的放线菌^[34]。在分离培养基中加入新生霉素可使小单孢菌属的出菌率显著增加^[35],庆大霉素也是分离该属常用的抑制剂。Bian 等^[36]在拟无枝酸菌属的分离中加入放线菌酮($50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、硫酸新霉素($4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和制霉菌素($50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。在放线菌的分离中,添加 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的放线菌酮或制霉菌素和 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的萘啶酮酸、 $50\sim 75\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的重铬酸钾可以有效地抑制真菌和细菌,且不影响放线菌的生长^[37]。

2 分离技术

海洋稀有放线菌传统分离培养技术是对自然样品进行多种预处理或富集培养后,用稀释涂布或者 Stamping/Scraping 的方法在含有抑制剂及一定盐分的选择培养基上完成接种,在合适环境下培养纯化并获得纯培养的过程。近些年,随着对难培养微生物研究的深入,高通量和原位培养分离技术应运而生。

2.1 传统分离技术

目前绝大多数海洋及陆生稀有放线菌分离依然采用稀释涂布的方法进行接种。

Stamping 方法^[38]目的在于对样品进行连续稀释。先将样品风干,若有结块则在无菌的研钵中碾碎。用直径约 2 cm 的无菌塑料泡沫塞子底面沾取样品,在琼脂培养基表面朝一个方向连续转印,使附着在塞子底面的样品达到连续稀释的效果。

Scraping 方法适用于分离海洋沉积物石块中的微生物。Jensen 等^[39]将过夜干燥的石块样品用无菌刮刀刮下粉末,用无菌湿棉签涂抹于琼脂平板表面或将岩石表面与培养基表面直接刮擦以完成

接种。

2.2 高通量培养分离技术

在海洋稀有放线菌传统分离中往往只能得到常见的、生长快速的微生物。海洋微生物生长繁殖速度具有显著差异。在平板上,肉眼可见的菌落中细胞数目至少要达到 1.0×10^5 个,一些自身生长速度较慢,或被其他微生物所抑制而达不到较多数量的微生物很容易被忽视^[40]。同时,生长繁殖速度快的微生物会产生大量过氧化物、自由基和超氧化物,使那些适应能力较差或生长较慢的微生物细胞受到抑制或氧化损伤^[41],这是许多微生物不能培养的主要原因。针对这一问题,近些年许多全新的方法应运而生,高通量培养即是一种^[42]。

Zengler 等^[43]发明的单液滴分离技术是将环境样品浓缩后封入琼脂糖等材料的微球中,将微球装入一个层用柱,柱子出口覆有 $0.8\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜,防止微球被冲出。用低营养浓度培养液对层析柱中的微球进行培养,并用流式细胞仪检测。单液滴分离有如下 3 方面优点:(1)样品中的微生物单独培养,生长缓慢的微生物不会受到生长快速微生物的影响或压制,而代谢产物或其他如信号分子等小分子物质可以自由在微球间交换。(2)培养基营养成分更低,更接近海洋等自然环境,更适应生长缓慢的、喜好寡营养的微生物生长。(3)流式细胞仪对微球的检测效率很高。

2.3 原位富集培养技术

传统海洋稀有放线菌分离培养方法所提供的环境十分单一,人为去除非目标种群,单一的营养成分组成,过高的营养浓度等,和海洋自然环境相距甚远。原位富集培养则是通过特殊的装置,在接近自然环境状态中富集微生物,再通过分子生物学或传统培养的方法将其分离出来。

2.3.1 扩散室

扩散室^[44]由一个环状的不锈钢密封环和两侧贴牢封固的 $0.03\text{ }\mu\text{m}$ 聚碳酸酯滤膜组成,密封环内部填充海洋微生物样品与琼脂的混合物。在原位环境或模拟环境条件下进行培养,扩散室的膜可使装置中的微生物与自然环境产生化学交流。扩散室很大程度上避免了对培养基组成的探索及优化,提供了在该环境下微生物生长所需要的一切组分。但是由于扩散室中的微生物一般会形成微

菌落,对其进行检测分离很困难,很难做到高通量培养分离^[45]。

2.3.2 分离芯片(IChip)

分离芯片是对扩散室的微型化与高通量化。1块具有上百个通孔的分离板两侧用0.03 μm孔径的聚碳酸酯滤膜覆盖,再用顶板和底板将滤膜固定在中间的分离板上,顶板和底板都有与分离板相对应的通孔。3块板都由疏水性聚甲醛塑料制成。使用时将分离板置于细胞悬液或者基于琼脂的培养基,每个通孔就会捕捉到含有微生物细胞的液体或固体培养基。合适的稀释倍数可以控制通孔中细胞的数量,再将分离板夹在滤膜与顶板底板构成的半透性屏障中间,在原位环境中培养。分离芯片可能因为扩散距离更短,更多的微生物细胞都能感应到外部环境并生长,更容易被分离出来^[45-46]。

2.3.3 贴膜分离技术

Hirsch等将0.22~0.45 μm孔隙纤维素酯滤膜覆盖在营养琼脂培养基上,并将自然样品平铺于滤膜表面。放线菌的基内菌丝能通过滤膜孔隙到达底层琼脂培养基,而非放线菌则留在滤膜表面。4 d培养后,除去滤膜进行2次培养,底层琼脂上的放线菌会形成菌落以便分离^[47]。此方法利用放线菌产生菌丝的特点,不依赖于特殊营养成分或抑制剂即能达到对放线菌的选择性分离。

2.3.4 Trap 技术

Trap 技术专门用于分离丝状微生物,尤其是放线菌。其装置的构造与扩散室相近,1个不锈钢或塑料密封环两侧被1张0.03 μm孔径的聚碳酸酯滤膜,1张0.2 μm孔径的滤膜胶连封固,但密封环中封着无菌琼脂。将Trap装置0.2 μm孔径的滤膜朝下放置在自然土壤样品中。放线菌的基内菌丝可以通过0.2 μm的滤膜孔隙进入琼脂。培养2~3 w后除去滤膜,再培养5~7 d待菌落形成,即可挑取或琼脂切片进行分离培养^[33]。与传统分离方法相比,Trap技术能避免非放线菌微生物在分离培养中的污染。

3 展望

众多研究表明,海洋稀有放线菌是新颖活性天然产物的重要资源,探索与改进其选择性分离方法的重点在:(1)抑制非目标微生物;(2)降低培养

基营养浓度,并延长培养时间;(3)培养环境尽可能接近目标微生物所在的自然生态环境。在自然环境中,不同微生物间具有复杂的相互作用关系,传统的培养和分离方法所提供的单一生物、化学环境会破坏这一关系,导致许多难培养微生物无法生长。笔者预见,随着原位培养分离技术的发展,新的稀有放线菌类群会不断地被发现。设计合理有效的海洋稀有放线菌选择性分离方法,结合宏基因组, DGGE 等分子生物学水平的免培养技术,对于海洋难培养微生物资源的开发和利用十分重要。

参考文献:

- [1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites[J]. J Antibiot (Tokyo), 2005, 58:1-26.
- [2] Baltz R H. Marcel faber roundtable: Is our antibiotic pipeline unproductive because of starvation, constipation or lack of inspiration?[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2006, 33:507-513.
- [3] Goodfellow M, Williams E. New strategies for the selective isolation of industrially important bacteria[J]. Biotechnol Genet Eng Rev, 1986(4):213-262.
- [4] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2011:27-32.
- [5] Cragg G M, Newman D J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads[J]. Pure Appl Chem, 2005, 77:7-24.
- [6] Fenical W, Jensen P R. Developing a new resource for drug discovery: Marine actinomycete bacteria[J]. Nat Chem Biol, 2006(2):666-673.
- [7] 常显波, 刘文正, 尹琦, 等. 海洋放线菌不同分离方法的比较研究[J]. 海洋科学, 2012, 36(8):35-39.
- [8] Kim C J, Lee K H, Shimazu A, et al. Isolation of rare *Actinomycetes* in various types of soil[J]. J Appl Microbiol Biotechnol, 1995, 23:36-42.
- [9] 李文均, 张忠泽, 姜成林. 几种主要稀有放线菌的选择性分离[J]. 国外医药抗生素分册. 2002, 23(1):18-22.
- [10] Hayakawa M, Kajiura T, Nonomura H. New methods for the highly selective isolation of *Streptosporangium* and *Dactylosporangium* from soil[J]. J Ferment Bioeng, 1991, 72:327-333.
- [11] Hayakawa M, Yoshida Y, Iimura Y. Selection of bioactive soil *Actinomycetes* belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster[J]. J Gen Appl Microbiol, 2004, 96:973-981.
- [12] Khamna S, Yokota A, Lumyong S. *Actinomycetes*

- isolated from medicinal plant rhizosphere soils: Diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production[J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 25:649-655.
- [13] Istianto Y, Koesoemowidodo R S A, Saputra H, et al. Application of phenol pretreatment for the isolation of rare *Actinomycetes* from Indonesian soil[J]. Microbiology (Indonesia), 2012(6):42-47.
- [14] Alferova I V, Terekhova L P. Use of the method of enriching of soil samples with calcium carbonate for isolation of *Actinomyces*[J]. Antibiot Khimioter, 1988, 33: 888-890.
- [15] Tsao P H, Leben C, Keitt G W. An enrichment method for isolating *Actinomycetes* that produce diffusible antifungal antibiotics[J]. Phytopathology, 1960, 50:88-89.
- [16] Qin S, Li J, Chen H H, et al. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare *Actinobacteria* from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75:6176-6186.
- [17] Tiwari K, Gupta R K. Diversity and isolation of rare *Actinomycetes*: An overview[J]. Crit Rev Microbiol, 2012, 39:256-294.
- [18] Ferriss R S. Effects of microwave oven treatment on microorganisms in soil[J]. Phytopathology, 1984, 74:121-126.
- [19] Bulina T I, Alferova I V, Terekhova L P. A novel approach to isolation of *Actinomycetes* involving irradiation of soil samples with microwaves[J]. Microbiology, 1997, 66:231-234.
- [20] Bredholdt H, Galatenko O A, Engelhardt K, et al. Rare *Actinomycete* bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: Isolation, diversity and biological activity[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(11):2756.
- [21] Hayakawa M, Otoguro M, Takeuchi T, et al. Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile *Actinomycetes* in soil and plant litter[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2000, 78:171-185.
- [22] Qin S, Li J, Chen H H, et al. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare *Actinobacteria* from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75:6176-6186.
- [23] Maldonado L A, Stach J E, Pathomaree W, et al. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2005, 87:11-18.
- [24] Palleroni N J. A chemotactic method for the isolation of *Actinoplanceae*[J]. Arch Microbiol, 1980, 128:53.
- [25] Hayakawa M. Studies on the isolation and distribution of rare *Actinomycetes* in soil[J]. Actinomycetol, 2008, 22: 12-19.
- [26] Hong K, Gao A H, Xie Q Y, et al. *Actinomycetes* for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China[J]. Mar Drugs, 2009, 7:24-44.
- [27] Subramani R, Aalbersberg W. Culturable rare *Actinomycetes*: Diversity, isolation and marine natural product discovery [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97(21):9291-9321.
- [28] Magarvey N A, Keller J M, Bernan V, et al. Isolation and characterization of novel marine-derived *Actinomycete* taxa rich in bioactive metabolites[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70:7520-7529.
- [29] Mincer T J, Fenical W, Jensen P R. Cultured and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71:7019-7028.
- [30] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil *Actinomycetes*[J]. J Ferment Technol, 1987, 65:501-509.
- [31] 彭云霞, 姜怡段, 淑蓉, 等. 稀有放线菌的选择性分离方法[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2007, 29(1):86-89.
- [32] Tamaki H, Sekiguchi Y S, Hanada K, et al. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71:2162-2169.
- [33] Gavrish E, Bollmann A, Epstein S, et al. A trap for in situ cultivation of filamentous actinobacteria[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 72(3):257-262.
- [34] Okami B, Hotta A K. Search and discovery of new antibiotics[C]//Goodfellow M, Williams S T, Mordarski M. *Actinomycetes* in biotechnology, London: Academic Press, 1988:33-67.
- [35] Qiu D, Ruan J, Huang Y. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora* [J]. Appl Environ Microbiol, 2008, 74:5593-5597.
- [36] Bian J, Li Y, Zhang L X, et al. *Amycolatopsis marina* sp. nov., an *Actinomycete* isolated from an ocean sediment[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59:477-481.
- [37] Williams S T, Wellington E M H. Principles and problems of selective isolation of microbes[C]//Bullock J D, Nisbet L J, Winstanley D J. Bioactive microbial

- products I: Search and discovery. London: Academic Press, 1982:9-26.
- [38] Mincer T J, Jensen P R, Kauffman C A, et al. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68:5005-5011.
- [39] Jensen P R, Gontang E, Fenical W, et al. Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(7):1039-1048.
- [40] Keller M, Zengler K. Tapping into microbial diversity[J]. Nature Reviews, 2004(2):141-150.
- [41] Bruns, Heribert C, Jerg O. Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterophilic bacteria from the central Baltic sea[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68:3978-3987.
- [42] Hameş-Kocabaş E E, Uzel A. Isolation strategies of marine-derived actinomycetes from sponge and sediment samples[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 88(3): 342-347.
- [43] Zengler K, Toledo G, Keller M, et al. Cultivating the uncultured[J]. PNAS, 2002, 99:15681-15686.
- [44] Kaerberlein T, Lewis K, Epstein S S. Isolating 'uncultivable' microorganisms in pure culture in a simulated natural environment[J]. Science, 2002, 296: 1127-1129.
- [45] Epstein S S. 未培养微生物[M]. 刘巍峰, 陈冠军, 译. 济南: 山东大学出版社, 2010:210-214.
- [46] Lewis K, Epstein S S, D'Onofrio A, et al. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites[J]. J Antibiot, 2010, 63:468-476.
- [47] Hirsch C F, Christensen D L. Novel method for selective isolation of actinomycetes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1983, 46(4):925-929.

Selective Isolations of Marine Rare *Actinomycetes*

YUAN Ye, HE Shan*

(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: During last two decades, marine rare actinomycetes has become research focus for natural products development due to their significant biodiversity and particular secondary metabolites. However, the further research has been largely limited by hardship in obtaining pure culture with traditional methods. This review summarizes the pretreatments and enrichments of the samples and the selection of medium and antimicrobial agents. The high-throughput and in-situ culturing techniques are also introduced.

Key words: marine rare *Actinomycetes*; selective isolation; high-throughput culture; in situ cultivation

(责任编辑 史小丽)