

高山草甸土壤放线菌分离方法研究

盛海彦¹, 李松龄², 杨改河³, 冯永忠^{3*}, 曹广民⁴

(1. 青海大学农牧学院, 青海 西宁 810003; 2. 青海大学农林科学院, 青海 西宁 810003;

3. 西北农林科技大学农学院, 陕西 杨凌 712100; 4. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810001)

摘要: 采用平板涂抹分离法研究了不同分离培养基及样品预处理对高山草甸土放线菌分离的效果。结果表明:土样在120℃干热处理1h后其悬浮液加0.05%SDS(十二烷基磺酸钠)和6%酵母膏,40℃振荡30min,能促进放线菌孢子萌发,增加放线菌的分离数量,并抑制杂菌生长,是高山草甸土放线菌分离时理想的预处理方法。改良HV琼脂和高氏1号加重铬酸钾(50mg/L)培养基是较好的分离培养基。

关键词: 高山草甸土;放线菌;分离方法;样品预处理

中图分类号: S154.38⁺³ **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2008)06-0101-05

放线菌是一类与人类关系非常密切的微生物,据统计,在1000多种抗生素中约有70%以上是由放线菌所产生^[1]。放线菌广泛存在于各类土壤中,近百年来,人们大约只研究和分离到10%~20%的土壤放线菌。国内外有关研究单位对放线菌分离方法的保密,阻碍着放线菌分离技术的提高。据安德荣^[2]等报道,重铬酸钾、放线菌酮对土壤真菌、细菌有明显抑制作用,而且可显著提高土壤放线菌的分离效率;司美茹等^[3]报道,链霉素不能用作分离放线菌时的细菌抑制剂,但120℃干热1.0h预处理土样能促进放线菌孢子萌发,增加放线菌的分离数量和种类;张学武等^[4]应用分散和差速离心法对土样进行预处理,用含有重铬酸钾(浓度为50mg/L~75mg/L)的HV琼脂培养基有效地提高稀有放线菌的分离效率。在土壤放线菌的分离工作中,由于采样地点、时间、样品处理、培养基选择和无菌条件等不同,分离效果差异很大。青藏高原是世界第三极,也是中国高山草甸土的集中分布区域,高山草甸土主要包括高山灌丛草甸土、高山湿草甸土、高山草原化草甸土和高山草甸土四个亚类,是耐寒放线菌重要的储藏库。但关于高山草甸土放线菌分离方法的报道较少。本试验用不同培养基和样品预处理对高山草甸土放线菌进行分离,目的是筛选出适合于高山草甸土放线菌生长的分离培养基及样品预处理方法,为高山草甸土中放线菌的分离提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 分别采自青海省三州五县典型

的高山草甸土0~30cm多点混合样。采样点基本情况见表1。

1.1.2 培养基 A. 改良HV琼脂:土壤浸提液200ml(1:5)、腐殖酸0.5g、琼脂20g、氯化钾1.7g、磷酸氢二钠0.5g/L;B. 高氏1号培养基;C. 甘油精氨酸琼脂;D. 察氏琼脂;E. 燕麦片琼脂;F. 高氏1号加重铬酸钾(150mg/L)培养基;G. 高氏1号加重铬酸钾(50mg/L)培养基。

1.2 方法

1.2.1 培养基的筛选 将Q-1号、Q-2号、Q-3号、Q-4号、Q-5号自然风干20d土壤样品过2mm筛孔,称取10g加入盛有90mL无菌水(10~15粒玻璃珠)的三角瓶中,常温振荡30min,取1mL土壤上清液,按梯度稀释至10⁻²(预备实验表明此浓度较适宜观察和计数),各取1滴(0.05mL),分别涂布于A、B、C、D、E、F、G七种平板培养基,重复4次,倒置于28℃温度下7~10d。观察和统计各类微生物的出现情况,鉴定放线菌到属^[5],筛选出适宜于高寒草甸土中放线菌分离的培养基。

1.2.2 土壤样品处理 将供试的Q-1号、Q-2号、Q-3号、Q-4号、Q-5号土样按表2预处理后涂布于筛选出的培养基平板上进行分离培养,重复3次,分别统计放线菌和细菌菌落数量。

2 结果分析

2.1 不同培养基对放线菌分离效果的影响

供试的5个土样,在A、B、C、D、E、F、G七种分离培养基上进行放线菌培养(稀释度10⁻²),分离的

收稿日期:2008-04-03

基金项目:中国生态网络网站项目;青海省重大科技攻关项目(2002-N-106)

作者简介:盛海彦(1967-),男,河南项城人,硕士,副教授,主要从事资源与环境生态研究。E-mail: xnsyh26@sina.com

通讯作者:冯永忠(1972-),男,甘肃渭源人,博士,讲师,主要从事资源与环境生态研究。E-mail: fengyz@nwsuaf.edu.cn

(C)1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

放线菌菌落数和放线菌种类(属数)差异显著(表 3)。用 A 培养基分离 Q-1 号土样、Q-3 号土样、Q-4 号土样得到的放线菌种类(属数)较其它培养基的多,且用 A 培养基分离 Q-3 号、Q-5 号土样得到的放线菌数菌落数量最多,但用 A 培养基分离放线菌时细菌菌落数量也相对其它培养基的多;用 B 培养基分离 Q-1 号、Q-2 号、Q-4 号土样得到的放线菌菌落数量较其它培养基的多,用 B 培养基分离放线菌时也有细菌,细菌菌落数量较 F、G 培养基的明显多,较 A、C、D、E 培养基的明显少;用 G 培养基分离放线菌时, Q-5 号土样得到的放线菌种类(属数)较其它培养基的多,而其他土样的放线菌菌落数量、放线菌种类(属数)较用 A 培养基分离的少,但细菌菌落数量明显的少;采用 F 培养基进行土壤放线菌分离,放线菌数菌落数量、放线菌种类

(属数)、细菌菌落数量明显较其它培养基的少,这是由于较高浓度的重铬酸钾(150 mg/L)能很好地抑制细菌和真菌生长,但也抑制了放线菌的生长,所得放线菌数目较少,从而,没有达到分离更多放线菌的目的,这一结果与杨宇容等研究结果相同^[6]。从七种培养基分离高山草甸土中的放线菌出菌效果来看,C、D、E、F 四种培养基的菌落多包括在 A 培养基中,G 培养基分离的放线菌种类(属数)与 B 培养基的基本相同,用 G 培养基分离 Q-2 号土样得到的放线菌种类最多的有 5 个属,平均 4 个属,而且 G 培养基放线菌菌落较大,杂菌少,放线菌菌落易挑出,因此,同时采用 A(改良 HV 琼脂)和 G(高氏 1 号加 50 mg/L 重铬酸钾)两种培养基,可以从高山草甸土壤样品中分离较多的放线菌菌株。

表 1 采样点自然概况

Table 1 The general situation of sample sites

采样地点 Sample site	土样编号 Sample No.	植被类型 Vegetable type	土壤类型 Soil type	平均海拔(m) Average height	pH
祁连县哦博乡 Ebo, Qilian County, Qinghai	Q-1	矮嵩草草甸 <i>Kobresia humilis</i> meadow	高山草甸土 Alpine meadow soil	3345	7.8
门源县马场 Machang, Menyuan County, Qinghai	Q-2	金露梅灌丛草甸 <i>Potentilla fruticosa</i> shrub	高山灌丛草甸土 Alpine scrubby meadow soil	3425	6.9
果洛藏族自治州达日县窝赛乡 Wos, Dari, Guoluo Tibetan Autonomous Prefecture	Q-3	矮嵩草草甸 <i>Kobresia humilis</i> meadow	高山草甸土 Alpine meadow soil	4066	7.3
玉树州藏族自治州曲玛莱县东风乡 Dongfeng, Qumal, Yisu Tibetan Autonomous Prefecture	Q-4	高山嵩草草甸 <i>Kobresia pygmaea</i> meadow	高山草原草甸土 Alpine steppe meadow soil	4215	7.6
玉树州藏族自治州杂多县蔡旦乡 Caidan, Zaduo, Yisu Tibetan Autonomous Prefecture	Q-5	藏嵩草草甸 <i>Kobresia tibetica</i> swamp meadow	高山湿草甸土 Alpine bog meadow soil	4848	6.7

表 2 土壤样品预处理方法

Table 2 Pre-treatment of the soil samples

处理 Treatment	处理方法 Method
CK(对照)	无菌水,常温振荡 30min。Vibrated at room temperature for 30min.
C1	120℃干热处理 1 h, 无菌水,常温振荡 30min。 The soils were treated with 120℃ for an hour, vibrated at room temperature for 30min.
C2	土壤悬浮液加 6%酵母膏,40℃常温振荡 30 min。 The soil suspension added with 6% yeast extract, vibrated at 40℃ for 30 min.
C3	土壤悬浮液加十二烷基磺酸钠(SDS)0.5 g/kg(5 mmol/L 磷酸缓冲液),40℃常温振荡 30 min。 The soil suspension added with 0.05% SDS, vibrated at 40℃ for 30 min.
C4	土壤悬浮液加 6%酵母膏,SDS 0.5 g/kg,40℃常温振荡 30 min。 The soil suspension added with 6% yeast extract, 0.05% SDS and vibrated at 40℃ for 30 min.
C5	120℃干热处理 1 h, 土壤悬浮液加 SDS 0.5 g/kg,40℃常温振荡 30 min。 The soils were treated with 120℃ for 1 hour, then the soil suspension added with 0.05% SDS and vibrated at 40℃ for 30 min.
C6	120℃干热处理 1 h, 土壤悬浮液加 SDS 0.5 g/kg,6%酵母膏,40℃常温振荡 30 min。 The soils were treated with 120℃ for 1 hour, then the soil suspension added with 6% yeast extract, 0.05% SDS and vibrated at 40℃ for 30 min.

表 3 不同培养基上放线菌菌落数、属数和细菌菌落数

Table 3 Quantity of actinomycetes, genus and quantity of bacteria in different media

土样编号 Sample No.	项目 Item	培养基 Medium type							
		A	B	C	D	E	F	G	
Q-1	放线菌 Actinomycete	菌落数 Quantity	12.25 _b	16.0 _a	5.5 _d	8.25 _{cd}	8.25 _{cd}	1.5 _e	11.5 _{bc}
		属数 Genus number	3.75 _a	3.25 _b	1.75 _c	1.25 _c	1.5 _c	1.0 _d	3.00 _{bc}
	细菌 Bacteria	菌落数 Quantity	36.0 _a	11.5 _c	30.5 _b	39.25 _a	29.0 _b	0 _e	4.75 _d
Q-2	放线菌 Actinomycete	菌落数 Quantity	33.5 _b	44.5 _a	22.75 _{cd}	18.5 _d	28.0 _{bc}	4.0 _e	42.0 _a
		属数 Genus number	3.75 _b	4.25 _a	2.25 _d	2.5 _d	3.25 _c	1.25 _e	4.0 _{ab}
	细菌 Bacteria	菌落数 Quantity	48.5 _a	30.5 _b	46.0 _a	51.5 _a	34.0 _b	0.5 _d	5.0 _c
Q-3	放线菌 Actinomycete	菌落数 Quantity	14.5 _a	13.75 _{ab}	8.0 _{cd}	5.75 _d	10.25 _c	2.25 _e	12.5 _b
		属数 Genus number	3.5 _a	3.0 _b	1.25 _d	1.75 _c	1.75 _c	1.0 _d	3.0 _b
	细菌 Bacteria	菌落数 Quantity	22.5 _b	14.0 _c	17.5 _{bc}	15.0 _c	34.0 _a	0 _e	4.24 _d
Q-4	放线菌 Actinomycete	菌落数 Quantity	5.75 _{bc}	9.0 _a	3.5 _d	3.5 _d	3.75 _{cd}	1.5 _e	7.25 _{ab}
		属数 Genus number	2.25 _a	2.0 _b	0.5 _d	0.75 _c	0.5 _d	0.5 _d	2.0 _b
	细菌 Bacteria	菌落数 Quantity	16.75 _a	6.5 _c	12.5 _b	8.0 _c	7.75 _c	0 _e	2.75 _d
Q-5	放线菌 Actinomycete	菌落数 Quantity	7.75 _a	5.25 _c	3.5 _d	3.0 _{de}	2.75 _e	2.5 _e	6.75 _b
		属数 Genus number	1.75 _a	1.75 _a	0.75 _b	0.5 _b	0.75 _b	0.5 _b	2.0 _a
	细菌 Bacteria	菌落数 Quantity	12.75 _a	7.75 _c	11.25 _{ab}	14.25 _a	9.0 _{bc}	0.5 _d	1.5 _d

注:同行数据后标的字母不同者表示差异达显著水平($P < 0.05$)(下表同)。

Note: Rows within list with the different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$), the same symbol was used for other table.

2.2 土壤样品不同预处理方法对放线菌分离效果的影响

供试的 5 个土样,分别用表 2 方法预处理后涂布于 A 和 G 分离培养基上进行放线菌培养(稀释度 10^{-2}),分离的放线菌和细菌菌落数差异显著(表 4)。与对照相比,预处理 C1 和 C6 则显著地提高了放线菌数量,经 C1 预处理后用 A 培养基使放线菌数量增加 15.67%~27.27%,用 G 培养基使放线菌数量增加 10.58%~41.67%。土壤样品经 C6 预处理后用 A 培养基分离放线菌,使不同土样放线菌的出菌率显著提高,幅度最小的是 Q-4 号土样的为 17.4%,幅度最大的是 Q-1 号土样的为 40.55%;用 G 培养基分离放线菌,使 Q-1 号、Q-2 号、Q-

3 号、Q-4 号、Q-5 号土样放线菌出菌率分别增加了 25.0%、31.47%、43.33%、15.8%、23.46%。其它 4 个预处理的放线菌数量较 CK 差异不显著。土壤样品经不同预处理后,用 A、G 培养基分离放线菌的种类(属)无显著差异(数据未列出),均是链霉菌属、小单孢菌属、马杜拉放线菌属、诺卡氏菌属,且链霉菌属的占放线菌总量的 83%以上。说明通过一定温度预处理有利于放线菌孢子萌发,在分离放线菌前,采用 120℃干热处理 1 h 可使放线菌孢子活化,以便获得更多放线菌。此外,处理 C6 与 C5 相比放线菌数量显著地提高了,处理 C4 与 C3 相比放线菌数量也显著地提高,这可能是由于酵母膏的加入活化了休眠孢子而使分离到的放线菌数量增加。

表 4 不同预处理对土壤的放线菌菌落数和细菌菌落数的影响

Table 4 The effects of different pre-treatments of the soil samples on quantity of actinomycetes and quantity of bacteria

土样编号 Sample No.	培养基 Medium type	微生物 Microorganism	预处理 Pre-treatment						
			CK	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Q-1	A	放线菌 Actinomycete	12.33 ^{cd}	16.67 ^{ab}	14.67 ^{bc}	11.0 ^d	15.33 ^{ab}	11.67 ^d	17.33 ^a
		细菌 Bacteria	36.00 ^a	31.67 ^a	35.33 ^a	11.67 ^{bc}	14.33 ^b	8.67 ^{cd}	5.33 ^d
	G	放线菌 Actinomycete	12.00 ^{bc}	13.67 ^{ab}	13.00 ^b	10.33 ^{cd}	12.33 ^{bc}	10.67 ^c	15.00 ^a
		细菌 Bacteria	5.33 ^a	5.00 ^a	5.67 ^a	2.00 ^b	1.00 ^{bc}	0.67 ^{bc}	0.00 ^c
Q-2	A	放线菌 Actinomycete	32.67 ^{bc}	40.33 ^a	35.67 ^b	29.67 ^c	34.33 ^b	29.00 ^c	43.33 ^a
		细菌 Bacteria	48.00 ^a	40.67 ^a	49.33 ^a	13.33 ^b	9.67 ^c	10.67 ^{bc}	2.67 ^d
	G	放线菌 Actinomycete	36.00 ^c	45.00 ^{ab}	42.67 ^b	32.67 ^c	45.33 ^{ab}	33.67 ^c	47.33 ^a
		细菌 Bacteria	5.00 ^a	5.33 ^a	6.00 ^a	1.33 ^{bc}	2.00 ^b	1.00 ^{bc}	0.67 ^c
Q-3	A	放线菌 Actinomycete	14.67 ^{bc}	18.67 ^a	15.00 ^{bc}	14.33 ^c	16.33 ^b	13.67 ^c	19.33 ^a
		细菌 Bacteria	23.00 ^a	21.67 ^{ab}	20.67 ^b	10.33 ^c	11.00 ^c	9.33 ^c	6.67 ^d
	G	放线菌 Actinomycete	12.33 ^c	16.00 ^{ab}	12.67 ^c	12.33 ^c	15.33 ^b	12.67 ^c	17.67 ^a
		细菌 Bacteria	5.00 ^a	4.67 ^{ab}	4.33 ^b	1.67 ^c	1.33 ^{bc}	0.67 ^d	0.33 ^e
Q-4	A	放线菌 Actinomycete	5.67 ^{bc}	6.67 ^a	5.33 ^c	5.67 ^{bc}	6.00 ^b	5.33 ^c	6.67 ^a
		细菌 Bacteria	15.33 ^a	14.00 ^a	14.67 ^a	7.67 ^b	8.33 ^b	5.33 ^c	4.33 ^c
	G	放线菌 Actinomycete	6.33 ^b	7.00 ^a	6.00 ^{bc}	5.67 ^{cd}	5.33 ^d	5.67 ^{cd}	7.33 ^a
		细菌 Bacteria	3.67 ^a	3.33 ^{ab}	3.00 ^b	1.67 ^{cd}	2.33 ^c	1.33 ^d	1.00 ^d
Q-5	A	放线菌 Actinomycete	7.00 ^b	8.33 ^a	7.33 ^b	7.00 ^b	7.67 ^b	7.00 ^b	8.67 ^a
		细菌 Bacteria	11.67 ^a	12.33 ^a	12.00 ^a	7.33 ^b	7.67 ^b	6.00 ^{bc}	4.67 ^c
	G	放线菌 Actinomycete	5.67 ^c	6.67 ^{ab}	6.00 ^{bc}	5.67 ^c	6.33 ^b	6.00 ^{bc}	7.00 ^a
		细菌 Bacteria	1.67 ^{ab}	2.00 ^a	1.67 ^{ab}	1.00 ^b	0.67 ^c	1.00 ^b	0.67 ^c

供试的 5 个土样经 C3、C4、C5、C6 后进行放线菌分离,培养基中细菌数量均显著降低(表 4),C3、C4、C5、C6 预处理的与对照(CK)的相比,分别降低了 37.19%~73.4%、34.28%~81.23%、40.12%~87.45%、71.0%~100%,表明高山草甸土壤样品用 C3、C4、C5、C6 预处理方法均可有效地抑制细菌的生长,其中以处理 C6 的抑制效果最好。

3 结论与讨论

土壤样品预处理目的在于减少细菌和真菌的污染,增加放线菌的出菌率。姜怡等^[7]认为风干土壤样品在 100℃ 或 120℃ 干热处理 60 min,可以有效分离一些稀有放线菌。Hayakawa^[8]建议土壤悬浮液加 0.5 g/kg(5 mmol/L 磷酸缓冲液)和 6% 酵母膏,40℃ 常温振荡 20 min 预处理分离放线菌,但对高山草甸土壤中放线菌分离时,120℃ 干热处理 1 h 细菌数量未显著降低,且对土壤悬浮液加 SDS 0.5 g/kg,6% 酵母膏的预处理的分离效果不理想。本研究采取 120℃ 干热处理 1 h,土壤悬浮液加 0.05% SDS 和 6% 酵母膏,40℃ 振荡 30 min,能促进放线菌孢子萌发,抑制杂菌生长,显著提高了放线菌的出菌率,为最佳的样品预处理方法。

为了从土壤中分离更多的放线菌可同时采用多种培养基,HV 琼脂培养基是以腐殖酸作为唯一碳源和氮源的培养基,腐殖酸是一种高度交联的聚合物,不易被真菌利用,可被放线菌利用,在不加任何抑制剂的情况下霉菌不能生长,有细菌生长但菌落较小,不影响放线菌的挑取。本研究用改良 HV 琼脂培养基(A)来分离高山草甸土中的放线菌效果较好,此可作高山草甸土放线菌分离的培养基。高氏一号培养基是分离放线菌常用培养基,适合放线菌,尤其是链霉菌生长,在不加抑制剂的情况下,细菌也大量生长,该培养基的优点是生长在其上的放线菌形态完整,非常有利于肉眼观察。在培养基中加入放线菌酮、制霉菌素、链霉素等^[9,10]来抑制细菌和真菌的生长可提高分离效果。杨宇容等^[6]较早的培养基中加重铬酸钾来抑制细菌和真菌来分离放线菌,有一定效果。由于重铬酸钾较其它抑制剂价格低,分离放线菌时已广为应用。徐成勇等^[11]对无锡市郊梅园土土壤放线菌分离认为,高氏 1 号培养基中加 250 mg/L 重铬酸钾的分离效果好。郑雅楠等^[12]在高氏 1 号培养基中加 150 mg/L 重铬酸钾对沈阳市东陵区玉米地土壤放线菌分离效果好。对于不同的土壤,培养基中加抑制剂的种类和量差异很

大。高山草甸土放线菌分离时,在高氏1号培养基中加重铬酸钾的适宜量为50 mg/L。

总的来说,高山草甸土壤土样品采取120℃干热处理1 h,土壤悬浮液加0.05% SDS和6%酵母膏,40℃振荡30 min,用改良HV琼脂和高氏1号加50 mg/L重铬酸钾两种培养基可分离出较多的放线菌。

参考文献:

- [1] 姜成林.放线菌资源开发利用[J].工业微生物,1989,19(6):31-35.
- [2] 安德荣,慕小倩,赵文军,等.土壤放线菌分离中抑制剂的应用研究[J].西北农业学报,2002,11(1):106-108.
- [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] 张学武,张建新.稀有放线菌的选择性分离[J].生命科学仪器,

- 2005,3(6):17-20.
- [5] 阮继生.放线菌分类基础[M].北京:科学出版社,1977.
- [6] 杨宇容,徐丽华,李启任,等.放线菌分离方法的研究I.抑制剂的选择[J].微生物学通报,1995,22(2):88-91.
- [7] 姜怡,段淑蓉,唐蜀昆,等.稀有放线菌分离方法[J].微生物学通报,2006,33(1):181-183.
- [8] Hayakawa M, Momose Y, Tamura T. A selective isolation method for *Actinomadura viridis* in soil[J]. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 79:287-289.
- [9] Nolan R, Cross T. *Actinomycetes in Biotechnology* [A]. Goodfellow M. Academic Press[C]. San Diego, 1988. 1-32.
- [10] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for a selective isolation of soil actinomycetes[J]. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65:501-509.
- [11] 徐成勇,袁野,黎丹辉,等.选择性分离放线菌[J].无锡轻工大学学报,1999,18(2):45-49.
- [12] 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.

Study on isolation methods of actinomycetes from Alpine Meadow soils

SHENG Hai-yan¹, LI Song-ling², YANG Gai-he³, Feng Yong-zhong^{3*}, CAO Guang-min⁴

(1. Agriculture and Animal Husbandry College, Qinghai University, Xining 810003, China;

2. Academy of Agriculture and Foyestry, Qinghai University, Xining 810003, China;

3. College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

4. Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001, China)

Abstract: The isolation effect of different basic culture media and pre-treatments on actinomycetes from alpine meadow was studied by using plate paint isolation methods. The results showed that: the best pre-treatments methods of the soil samples on actinomycete isolation is to treat with 120℃ for 1 hour, then to add 6% yeast extract and 0.05% SDS and vibrate at 40℃ for 30 minutes. It could promote actinomycetes spore sprouting to increase the quantity of actinomycetes and inhibit the development of other microorganisms. Meanwhile, the gause's starch agar media added with K₂Cr₂O₇ (50 mg/L) and modified HV media were best culture medium for isolation of actinomycetes.

Keywords: alpine meadow soil; actinomycete; isolation method; pre-treatment