

盐碱土中放线菌分离方法研究*

来航线^a, 盛 敏^b, 杨保伟^c, 薛泉宏^a

(西北农林科技大学 a 资源与环境学院; b 生命科学学院; c 食品科学与工程学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 研究了不同分离培养基及样品预处理(热处理和化学处理)对盐碱土中放线菌分离效果的影响。结果表明: (1) 碱土中放线菌的总数、属数和链霉菌类群数极显著地高于盐土; (2) 高氏1号琼脂为最佳的基础培养基, 精氨酸-甘油琼脂次之; (3) A₃培养基(高氏1号琼脂, NaCl 0.5 g/kg, pH 9.0)为碱土的最佳分离培养基; A₁培养基(高氏1号琼脂, NaCl 50 g/kg, pH 7.0)为盐土的最佳分离培养基; (4) 盐碱土用无菌的20 g/kg 腐殖酸溶液浸泡, 于40℃下振荡20 min, 可提高放线菌的出菌率并抑制杂菌生长。

[关键词] 盐碱土; 放线菌; 分离培养基; 样品预处理; 出菌率

[中图分类号] S154.38⁺3 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)10-0113-05

自从Waksman发现链霉菌以来, 人类对放线菌的研究越来越深入。放线菌作为在工业上有重大利用价值的一类微生物, 其为人类做出了巨大贡献^[1]。迄今为止, 已发现的由微生物产生的生理活性物质中, 放线菌产生的约占70%^[2]。此外, 放线菌还产生其他各种工、农业有用的产品, 如酶制剂等。但是, 现有的放线菌资源还远远不能满足人类对其的需求, 目前已报道放线菌有70多个属, 近千个种^[3], 可能仅占实有放线菌的10%~20%^[4]。因此, 开展大规模放线菌资源调查以丰富放线菌资源库就显得非常必要。但现有的放线菌分离培养基多达30余种^[5-6], 而待调查土样也很多, 如果培养基种类过多将加大分离工作量, 若能筛选几种出菌率高的代表性分离培养基, 就可在保证获得绝大部分放线菌资源信息的情况下, 有效减少工作量, 加快研究进度。此外, 有研究^[7-8]发现, 对土壤样品进行预处理(热处理和化学

处理)可提高放线菌出菌率。样品预处理的目的是减少非放线菌如细菌等的干扰, 使放线菌更好的被筛选出来。目前, 各国的科学家都在探索这个问题, 已设计出许多好的处理方法, 并得到了较好的效果^[9]。但目前关于盐碱土这一特殊生态系统中放线菌分离方法的报道较少。本试验研究了不同培养基及样品预处理对盐碱土放线菌出菌率、种属组成的影响, 旨在寻找适合于盐碱土中放线菌生长的分离培养基及样品预处理方法, 以为盐碱土中放线菌的分离提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

供试样品为两类典型的盐碱土, 即碱土和盐土, 其基本性质见表1。

表1 供试盐碱土的基本性质

Table 1 Characteristics of saline-alkaline soils

土壤类型 Soil type	水溶盐总量/ (g · kg ⁻¹) Water soluble saline quantity	CO ₃ ²⁻ / (g · kg ⁻¹)	HCO ₃ ⁻ / (g · kg ⁻¹)	Cl ⁻ / (g · kg ⁻¹)	SO ₄ ²⁻ / (g · kg ⁻¹)	Mg ²⁺ / (g · kg ⁻¹)	Ca ²⁺ / (g · kg ⁻¹)
碱土 Alkaline soil	2.32	0.01	0.28	0.49	0.05	0.05	0.10
盐土 Saline soil	252.00	0.02	1.28	52.27	50.45	0.38	11.25
土壤类型 Soil type	K ⁺ / (g · kg ⁻¹)	Na ⁺ / (g · kg ⁻¹)	pH	速效氮/ (mg · kg ⁻¹) Available N	速效磷/ (mg · kg ⁻¹) Available P	全磷/ (g · kg ⁻¹) Total P	有机质/ (g · kg ⁻¹) Organic matter
碱土 Alkaline soil	0.001	0.43	9.49	5.63	107.00	6.1	6.44
盐土 Saline soil	0.26	23.31	8.71	21.19	96.32	6.2	32.22

[收稿日期] 2006-07-03
[基金项目] 西北农林科技大学土壤学博士点基金项目(2003)
[作者简介] 来航线(1964-), 男, 陕西礼泉人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事微生物学资源利用和微生物生态研究。E-mail: laihangxi-an@163.com

1 2 方 法

1 2 1 不同培养基对放线菌分离效果的影响 以高氏1号琼脂(基础培养基A)^[10]、改良腐殖酸琼脂(B)(腐殖酸1 g, KCl 1.7 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, 放线酮50 mg, Na₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, CaCO₃ 0.02 g, 核黄素0.5 mg, 金维他0.78 g, 琼脂18 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.2~7.4)、甘油精氨酸琼脂(C)^[11]、甘油天门冬素琼脂(D)^[11]、葡萄糖-天门冬氨酸琼脂(G)^[11]、精氨酸-甘油琼脂(H)^[11]、蔗糖察氏琼脂(I)^[11]、秸秆腐解物琼脂(J)^[7]和改良黄豆粉浸汁琼脂(K)(可溶性淀粉5 g, 蔗糖10 g, 蛋白胨2 g, 酵母膏2 g, NaCl 2 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄

·7H₂O 0.5 g, CaCO₃ 1 g, 20 g/kg 黄豆粉浸汁1 000 mL, 琼脂18 g, pH 7.2~7.4)等9种基础培养基为分离培养基。同时每个基础培养基下设5个盐碱处理,分别为对照组CK(NaCl 0.5 g/kg, pH 7.0), 1(NaCl 50 g/kg, pH 7.0), 2(NaCl 100 g/kg, pH 7.0), 3(NaCl 0.5 g/kg, pH 9.0), 4(NaCl 0.5 g/kg, pH 11.0), 共计45个处理,每处理重复3次。采用稀释平板涂布法分离供试土样中的放线菌,统计放线菌数量及种类,分析比较不同培养基的分离效果。

1 2 2 样品不同预处理方法对放线菌分离效果的影响 供试土样的预处理方法见表2。

表2 样品预处理方法

Table 2 Pre-treatment of saline-alkaline soils

编号 Sign	方法 Method	编号 Sign	方法 Method
CK	无菌水, 常温振荡20 min V ibrated at room temperature for 20 m inutes	5	十二烷基硫酸钠(SDS) 1 g/kg, 40 振荡 20 m in SDS 1 g/kg, vibrated at 40 for 20 m inutes
1	120 × 1 h (干热), 无菌水, 常温振荡 20 m in Dried at 120 for one hour, vibrated at room temperature for 20 m inutes	6	十二烷基硫酸钠(SDS) 0.5 g/kg+ 酵母膏(YE) 60 g/kg, 40 振荡 20 m in SDS 0.5 g/kg+ YE 60 g/kg, vibrated at 40 for 20 m inutes
2	酵母膏(YE) 20 g/kg, 40 振荡 20 m in YE 20 g/kg, vibrated at 40 for 20 m inutes	7	十二烷基硫酸钠(SDS) 0.5 g/kg+ 腐殖酸(HA) 10 g/kg, 40 振荡 20 m in SDS 0.5 g/kg+ HA 10 g/kg, vibrated at 40 for 20 m inutes
3	腐殖酸(HA) 20 g/kg, 40 振荡 20 m in HA 20 g/kg, vibrated at 40 for 20 m inutes	8	十二烷基硫酸钠(SDS) 0.5 g/kg+ 酪蛋白水解物(CA) 10 g/kg, 40 振荡 20 m in SDS 0.5 g/kg+ CA 10 g/kg, vibrated at 40 for 20 m inutes
4	酪蛋白水解物(CA) 10 g/kg, 40 振荡 20 m in CA 10 g/kg, vibrated at 40 for 20 m inutes		

供试土样按表2方法处理后,放线菌分别以高氏1号琼脂^[10]、甘油天门冬素琼脂^[11]、精氨酸-甘油琼脂^[11]、秸秆腐解物琼脂^[7]为分离培养基,细菌以牛肉膏蛋白胨琼脂^[10]为分离培养基,采用稀释平板涂布法对放线菌和细菌进行分离,并统计放线菌和细菌的总数。

1 2 3 放线菌初步鉴定与分类 以形态特征为主、培养特征和生理生化特征为辅的原则,将放线菌鉴定到属,其中链霉菌鉴定到类群^[12-13]。

表3 各基础培养基上的放线菌总数、属数和链霉菌类群数

Table 3 Quantity of actinomycetes, genus and streptomycetes varieties in basic culture media

基础培养基 Basic culture media	放线菌总数/g ⁻¹ Actinomycetes number	放线菌属数 Genus number	链霉菌类群数 Streptomycetes kind number	基础培养基 Basic culture media	放线菌总数/g ⁻¹ Actinomycetes number	放线菌属数 Genus number	链霉菌类群数 Streptomycetes kind number
A	108 398 A	1.53 A	4.3 A	H	25 553 B	1.67 A	4.2 A
B	6 130 C	0.57 C	1.3 C	I	3 947 C	0.77 C	1.53 C
C	3 957 C	0.47 C	0.9 C	J	7 943 C	0.7 C	1.7 C
D	3 136 C	0.7 C	0.57 C	K	12 401 C	0.6 C	1.1 C
G	3 107 C	1.13 B	2.6 B				

注: 同列数据后标不同字母者表示差异达极显著水平(P<0.01)。

Note: Datas with different letters within the same line are extremely difference (P<0.01).

1 2 4 数据分析 采用SA S 统计分析软件^[14]进行统计分析。

2 结果与分析

2 1 不同培养基对放线菌分离效果的影响

2 1 1 不同基础培养基的分离效果 采用9种基础培养基对放线菌进行平板稀释法分离,并统计分离获得的放线菌总数、属数和链霉菌类群数,结果见表3。

由表 3 可知, 基础培养基 A 与 H 的放线菌总数显著高于其他基础培养基 ($P < 0.01$), 基础培养基 A 又极显著地高于 H ($P < 0.01$), 基础培养基 A 中的放线菌总数分别是其他基础培养基 (H, K, J, B, C, I, D, G) 的 4.24, 8.74, 13.65, 17.68, 27.39, 27.46, 34.57 和 34.89 倍。由此可知, 用基础培养基 A 分离盐碱土所得的放线菌数量最多, 基础培养基 H 次之。用基础培养基 A, G 和 H 分离到的放线菌属数和链霉菌

类群数均显著高于其他基础培养基, 基础培养基 A 和 H 间差异性不显著, 基础培养基 G 与 A 及 H 的差异性达极显著水平 ($P < 0.01$)。通过对不同基础培养基上分离获得的放线菌总数、属数及链霉菌类群数的综合比较可知, 基础培养基 A 为最佳基础培养基, H 次之。

2.1.2 不同盐碱处理的分离效果 5 种不同盐碱处理对放线菌分离效果的影响见表 4。

表 4 各盐碱处理下的放线菌总数、属数和链霉菌类群数

Table 4 Quantity of actinomycetes, genus and streptomyces varieties in isolation culture with different pH or saline concentrations

盐碱处理 Treatment	放线菌总数/ g^{-1} Actinomycetes number	放线菌属数 Genus number	链霉菌类群数 Streptomyces kind number
CK	31 312 aA	0.96 cB	2.63 bAB
1	23 233 bB	1.13 abAB	2.28 cAB
2	0 dD	0 dC	0 eC
3	32 528 aA	1.31 aA	3.30 aA
4	9 910 cC	1.11 bAB	1.91 dB

注: 同列数据后标不同小写字母者表示差异达显著水平 ($P < 0.05$), 不同大写字母者表示差异达极显著水平 ($P < 0.01$)。

Note: Data with different small letters within the same line are difference ($P < 0.05$), Data with different capital letters within the same line are extremely difference ($P < 0.01$), the same below.

从表 4 可以看出, 用经过不同盐碱处理的基础培养基分离盐碱土得到的放线菌总数、属数和链霉菌类群数存在较大的差异。5 种不同处理的放线菌总数表现为处理 3 > CK > 处理 1 > 处理 4 > 处理 2; 属数表现为处理 3 > 处理 1 > 处理 4 > CK > 处理 2; 链霉菌类群数表现为处理 3 > CK > 处理 1 > 处理 4 > 处理 2。可见, 盐碱处理 3 (NaCl 0.5 g/kg, pH 9.0) 能提高盐碱土中放线菌的出菌率 (总数、属和链霉菌类群)。研究中还发现, 处理 1 (NaCl 50 g/kg, pH 7.0) 能增加盐碱土中一些特殊放线菌的出菌率, 如糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*) 和高温单孢菌属 (*Thermomonospora*) 等。因此, 在分离盐碱土中的放线菌时, 可通过适当提高培养基质的 pH 来增加放线菌数量、属数以及链霉菌的类群数, 但 pH 不宜过高, 以 pH 9.0 为最佳, 这是因为过高的 pH 会影响培养基中营养成分如 Fe^{2+} , HPO_4^{2-} 等离子的活性; 同时在培养基质中加入一定量的 NaCl 可增加放线菌属的出菌率, 但 NaCl 含量过高会降低放线菌的总数和链霉菌的类群数, 因此 NaCl 的浓度也不宜过高, 应以 50 g/kg 为宜, 这是因为高浓度 NaCl 可能会降低琼脂的凝固性和培养基中营养成分 (如淀粉) 的溶解度, 增强蛋白质等营养物质的盐析作用等, 从而对放线菌的营养过程产生抑制作用。

通过对土壤类型 × 盐碱处理 × 基础培养基的交

互作用分析可知, 各土壤类型相应的最佳培养基类型为: 碱土的最佳分离培养基为 A₃ 号培养基 (高氏 1 号琼脂, NaCl 0.5 g/kg, pH 9.0), 培养基 A_{CK}, A₁, B₃, H_{CK} 和 H₁ 次之; 盐土的最佳分离培养基为 A₁ 号培养基 (高氏 1 号琼脂, NaCl 50 g/kg, pH 7.0), 培养基 A_{CK}, A₃, D₁ 和 J₃ 次之。

2.2 土样不同预处理方法对放线菌分离效果的影响

对供试土样分别进行 9 种不同预处理后, 采用平板涂抹法进行微生物分离, 统计放线菌和细菌总数, 其结果见表 5。

由表 5 可知, 盐碱土经预处理后其放线菌和细菌数量发生了极显著的变化。处理 1, 2, 5, 6, 7 和 8 的放线菌总数均显著降低, 较对照分别降低 4.64%, 25.24%, 69.33%, 74.38%, 81.70% 和 93.22%。而处理 3 和 4 则显著地提高了放线菌数量, 较对照分别提高 22.77% 和 17.08%。这可能是由于腐殖酸 (HA) 和酪蛋白水解物 (CA) 的加入活化了休眠孢子而使分离到的放线菌数量增加。

由表 5 还可知, 与对照相比, 处理 1~8 的细菌数量均显著降低, 分别较对照降低了 59.54%, 15.27%, 81.35%, 10.62%, 14.42%, 37.05%, 12.76% 和 27.83%。表明各样品预处理方法均可有效地抑制细菌的生长, 其中以处理 3 的抑制效果最

好。

表5 土样不同预处理方法对放线菌分离效果的影响

Table 5 Effect of soil pre-treatment on the isolation of actinomycetes g^{-1}

样品预处理方法 Treatment method	放线菌总数 Actinomycete quantity	细菌总数 Bacteria quantity	样品预处理方法 Treatment method	放线菌总数 Actinomycete quantity	细菌总数 Bacteria quantity
1	5 977.9 bB	7 244.5 eD	6	1 146.9 eE	11 271.8 dC
2	4 686.9 cC	15 171.5 bB	7	1 606 d DE	15 622.1 bB
3	7 696.5 aA	3 340.4 fE	8	425 fF	12 924 cC
4	7 339.7 aA	16 004.3 bAB	CK	6 268.9 bB	17 906.5 aA
5	1 922.7 dD	15 323.8 bB			

由以上分析可知,处理3 和处理4 可显著提高放线菌的出菌率,且对细菌具有显著抑制作用,其细菌数仅为对照的18.65%和89.38%。故处理3 为最佳的样品预处理方法,处理4 次之。

2.3 盐土和碱土中放线菌总数、属数和链霉菌类群数分析

表6 表明,碱土和盐土中放线菌总数、放线菌属

数和链霉菌类群数的差异均达极显著水平($P < 0.01$),且碱土的放线菌总数、属数和链霉菌类群数均大于盐土,分别是盐土放线菌总数、属数和链霉菌类群数的13.14、1.62 和1.90 倍。这可能是由于碱土的碱性环境更有利于放线菌的生长和发育。

表6 盐土和碱土中放线菌总数、属数和链霉菌类群数

Table 6 Quantity of actinomycetes, genus and streptomycetes varieties in saline or alkaline soils

土壤类型 Soil type	放线菌总数/ g^{-1} Actinomycetes quantity	放线菌属数 Genus quantity	链霉菌类群数 Streptomycetes kinds quantity	土壤类型 Soil type	放线菌总数/ g^{-1} Actinomycetes quantity	放线菌属数 Genus quantity	链霉菌类群数 Streptomycetes kinds quantity
碱土 Alkaline soil	36 049	1 118.52	2 651.9	盐土 Saline soil	2 744	0.688 89	1 392.6

3 讨 论

盐碱环境以其独特的理化性质和土壤形成条件,强烈影响并决定着其中放线菌的生理生化特性和营养特征,要从盐碱环境获得更多的放线菌纯培养,就需要依据其生境特征来设计培养基和相应的分离方法。已有研究^[15-17]表明,可以通过选择性的配制培养基(如营养成分、添加抑制剂^[18-19]等)及选择一定的培养条件(如培养温度、培养基酸碱度、盐度等)来高效地分离特定环境中的放线菌。本试验根据盐碱土的基本性质和放线菌的生长特性,设计了贫脊、营养丰富、不同碱度和盐度的培养基来对盐碱土中的放线菌进行分离,结果发现营养贫瘠型培养基(如高氏1 号琼脂)较营养丰富型(如改良黄豆粉浸汁琼脂)培养基的分离效果好,碱土用偏碱性的培养基(pH 9.0)、盐土用含有一定量盐分(NaCl 50

g/kg)的培养基分离放线菌的效果较好,所得到的放线菌数量、属数以及链霉菌类群数均较多。

为了抑制杂菌的生长,通常对土壤样品进行热处理和化学处理,以使放线菌能更好地显露出来。本试验比较了9 种预处理方法对放线菌分离效果的影响,结果发现,与对照相比,无论是热处理(处理1)还是化学处理(处理2~ 8)均可显著降低细菌总数,但其对放线菌总数的影响却存在着较大差异,热处理对放线菌总数无显著影响,而化学处理的影响较大;处理3 和处理4 显著提高了放线菌总数,而处理2 和处理5~ 8 却使放线菌总数降低。

综上所述,在选择土样的预处理方法和分离培养基时,应综合考虑土壤类型及其相关的基本性质,做到“有的放矢”方能使放线菌的分离效果达到最佳,使土壤中的放线菌尽可能多地显露出来。

[参考文献]

- [1] Waksman S, Henrici-Oliver A. The nomenclature and classification of the actinomycetes[J]. J Bacteriol, 1943, 46: 337-341.
- [2] 姜成林. 放线菌资源开发利用[J]. 工业微生物, 1989, 19(6): 31-35.
- [3] 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.

- [4] 李荣森, 罗绍彬, 张用梅, 等. 微生物防治害虫[M]. 北京: 科学出版社, 1983: 20
- [5] 梁泉峰, 池振明. 间型假丝酵母菌株对多种水果蔬菜腐败霉菌的拮抗效果和拮抗机制的研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 28(1): 34-38
- [6] 姜成林, 徐丽华, 杨宇容, 等. 微生物资源学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 16-23
- [7] 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
- [8] 胥秀英, 郑一敏, 温寿祯, 等. 土壤放线菌分离方法的初步研究[J]. 生物学杂志, 2000, 17(2): 16-17
- [9] 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, 1(2): 45-49
- [10] 程丽娟, 薛泉宏, 来航线, 等. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 1988
- [11] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975
- [12] 阮断生. 放线菌分类基础[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 163-167
- [13] 阮继生, 刘志恒. 放线菌研究及应用[M]. 北京: 科学出版社, 1990
- [14] 胡小平, 王长发. SAS 基础及统计实例教程[M]. 西安: 西安地图出版社, 2001: 160-164
- [15] 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
- [16] Hayakawa M, Momose Y, Kajinra T, et al. A selective isolation method for *Actinomadura viridis* in soil[J]. J Fernem Biog, 1995, 79: 287
- [17] 杨宇容, 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
- [18] 杨宇容, 徐丽华, 李启任, 等. 放线菌分离方法的研究 I. 抑制剂的筛选[J]. 微生物学通报, 1995, 22(2): 88-91
- [19] Athalye M, Lacey J, Goodfellow M. Selective isolation and enumeration of *Actinomycetes* using rifampicin[J]. J Appl Bacteriol, 1981, 51: 289

Study on the isolation methods of actinomycetes from saline-alkaline soils

LA I Hang-xian^a, SHENG Min^b, YANG Bao-wei^c, XUE Quan-hong^a

(a College of Resource and Environment; b College of Life Science; c College of Food Science and Engineering,

Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effect of basic culture media, saline content, pH and different pretreatments of saline-alkaline soils on actinomycete isolation was studied. The results showed that the quantity of actinomycetes, genus and streptomycetes varieties in alkaline soils was higher than that in saline soils; Gao Shi No. 1 agar was best among all the basic culture media, next was Arginine-Glycerine agar; The basic culture media holding the moderate pH (pH 9.0) and saline concentration (NaCl 50 g/kg) was good to actinomycete isolation; A₃ (NaCl 0.5 g/kg, pH 9.0) was the best isolation culture media when applying for alkaline soils; A₁ (NaCl 50 g/kg, pH 7.0) was the best isolation culture media when applying for saline soils; It could promote actinomycete development and inhibit the development of other microorganism when the saline-alkaline soil was immersed in HA 20 g/kg solution and vibrated at 40 for 20 minutes.

Key words: saline-alkaline soil; actinomycete; isolation culture media; pretreatment; microbe ratio isolation