

青海高寒草甸土壤放线菌区系研究

王启兰 曹广民 姜文波 张耀生

(中国科学院西北高原生物研究所 西宁 810008)

摘 要: 2001~2002 年从海北高寒草甸生态系统采集土样,用不同方法从中分离放线菌 300 余株,根据其形态和分类特征,分别归入小单孢菌属 (*Micromonospora*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*)、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*),并将链霉菌归入 7 个类群。同时对 230 株中温菌和 110 株低温菌的部分酶活性及其对真菌和细菌的拮抗性进行了测定,发现链霉菌不仅具有许多酶活性,而且对真菌和细菌有拮抗性。

关键词: 高寒草甸,放线菌区系,放线菌资源

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2004) 06-0733-04

放线菌作为分泌抗生素及其它多种生物活性物质的一类宝贵生物资源,日益引起国内外学者的关注。目前,国内外对土壤放线菌的研究大多都是对新种、新属的报道^[1-6]、分离手段的报道^[7,8]以及对产酶条件等方面的研究,但对作为菌种来源基础的放线菌区系的研究国外并不多见^[9],国内除姜成林等^[10-13]对云南各种环境的放线菌区系作了详细的研究,其它地区对土壤放线菌区系的研究仅见于山西^[14,15]。对青藏高原土壤放线菌的研究只见于冯清平^[16] (1988) 从青海湖鸟岛附近的湖泥中分离了灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 的一个新亚种以及张国伟等^[17] (1986) 从青藏高原土壤中分离到两个链霉菌属 (*Streptomyces*) 的新亚种。金露梅灌丛和嵩草草甸是青藏高原高寒草甸的典型植被类型^[18],其土壤放线菌区系及资源分布的系统性研究仍未见报道。

本文就高寒草甸不同植被、不同土壤类型的放线菌种类组成及分布特征进行了初步的研究,为高寒草甸土壤放线菌资源提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 高寒草甸概况和土壤样品来源

本实验地选择在金露梅灌丛和嵩草草甸的主要分布区——中国科学院高寒草甸生态系统开放实验站(以下简称定位站),此站位于青藏高原东北隅的

祁连山谷地(37°29'~37°45' N, 101°12'~101°23' E),站区山地海拔 4000m,谷地 2900m~3500m。站区属于典型的高原大陆性气候,夏季受东南季风气候而冬季受西伯利亚寒流的影响,一年中无明显的四季之分,暖季短暂而凉爽,冷季寒冷而漫长。年平均气温 1.7℃,年极端最高气温 27.6℃,极端最低气温 37.1℃。年降水量 426mm~860mm,其中 80%集中于植物生长季的 5~9 月。无绝对无霜期,年平均日照 2462.7h。土壤类型有高山草甸土、高山灌丛草甸土和沼泽土。土壤呈有机质及全量养分丰富而速效养分贫乏的特点。植被类型为青藏高原典型的地带性植被,以金露梅 (*Potentilla fruticosa*) 为建群种 (Constructive species) 的高寒灌丛草甸分布于山地阴坡、山麓及河谷低地;以嵩草属 (*Kobresia humilis*) 植物为建群种的高寒嵩草草甸,分布在山地阳坡和滩地;以藏嵩草 (*Kobresia tibetica*) 为建群种的沼泽草甸分布于河滩地。群落结构简单,植物生长期短、生物生产力较低。

于 2001 年 4~10 月在定位站区按表 1 所示 7 个样区采集土样,采样深度为 0~20cm,5~10 点混和为一份样品。所采样品带回实验室风干研碎过筛,7d 内分离菌种。

1.2 培养基和分离方法

土样风干后,120℃干热 1h^[19],土样稀释 10 和 100 倍,再加 1% 苯酚或 0.05% 的 SDS,40℃悬浮

基金项目:国家自然科学基金(40471133);中国科学院知识创新工程重大项目“黑河流域水-生态-经济系统综合管理试验示范”(Kzcx1-09-01);中国科学院西北高原生物所所长基金(110210116);中国科学院西北高原生物研究所知识创新工程重点研究领域(cjc 020144)

作者简介:王启兰(1964-),女,青海人,副研,从事微生物生态学研究。Tel:86-971-6101116;Fax:86-971-6143282;E-mail:wql@mwipb.ac.cn

收稿日期:2004-03-03,修回日期:2004-04-26

在植物群落中数量最多,高度最大,群落学作用最明显的种称建群种。

表 1 7 个采样点的自然概况

Table 1 The general situation of seven sample site

Sample site	Sample No.	Vegetable type	Soil properties	pH	Height/m
Gan chai bottom land		<i>Potentilla froitcosa</i> shrub	Leached alpine scrubby meadow soil	7.4	3420
Kou men zi		<i>Kobresia pygmaea</i> meadow	Carbonate alpine meadow soil	8.1	3270
Leng long mountain		Cushion vegetation	Alpine frost tundra soil	8.2	3800
Wu ming bottom land		<i>Kobresia humilis</i> meadow	Alpine meadow soil	7.5	3200
Yu er mountain		<i>Potentilla froitcosa</i> shrub	Alpine scrubby meadow soil	7.4	3300
Luan hai zi		<i>Kobresia tibetica</i> swamp meadow	Peat bog soil	7.9	3200
Wu ming bottom land		<i>Elymus nutans</i> meadow	Alpine meadow soil	7.5	3200

30min, 采用平板涂布法进行分离。培养基采用 YIM-2^[20]、改良水解酪素琼脂、甘油精氨酸琼脂、甘油门冬酰胺琼脂、高氏一号, 为抑制真菌和细菌, 在培养基中加 50 μ g/mL 重铬酸钾。将平板置于 28 和 8 培养, 分别在 7d、30d、56d 后挑菌。

1.3 形态和培养特征观察

放线菌经纯化后, 用埋片法适时取片, 光学显微镜观察形态特征, 按常规方法鉴定到属^[21, 22]。

1.4 放线菌生理生化特性测定

1.4.1 几种酶活性测定: 淀粉水解、纤维素分解、硝酸盐还原、明胶利用、溶菌酶、凝乳酶活性根据文献 [21, 23] 的方法测定。

1.4.2 拮抗性测定: 采用琼脂移块法。试验菌为大肠杆菌 (*Escherichia coil*)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)、青霉 (*Penicillium* sp.) 和毛霉 (*Mucor* sp.)。

1.5 细胞化学组分分析

采样快速薄层层析法 (Thin layer chromatography)^[24] 进行细胞壁及全细胞氨基酸和糖组分分析。

1.6 枝菌酸分析

对型菌分析枝菌酸^[21]。

2 结果和讨论

2.1 土壤样品放线菌数量统计

海北高寒草甸生态系统不同植被土壤放线菌总数见表 2, 中温菌数量以无名滩的矮蒿草草甸、垂穗披碱草草甸、鱼儿山的金露梅灌丛最高, 甘柴滩金露梅灌丛和口门子小嵩草草甸次之, 乱海子藏蒿草沼泽草甸位居第三, 冷龙岭垫状植被土壤的放线菌数量最低, 分别为 82.17×10^3 , 72.28×10^3 , 76.2×10^3 , 59.6×10^3 , 56.23×10^3 , 38.5×10^3 和 12.34×10^3 。低温菌数量在冷龙岭垫状植被和藏蒿草沼泽草甸明显低, 其它样区的放线菌数量差异不明显 ($p > 0.5$)。各样区的中温菌数量均比低温菌数量明显高 ($p < 0.05$)。从各样区的 pH 来看, 冷龙岭的 pH 最高, 为 8.2, 其菌数最低, 次之为口门子的小嵩草草甸和乱海子的藏蒿草沼泽草甸, 分别为 8.1 和 7.9, 其菌数

较前者高, 剩余样区的 pH 为 7.4 或 7.5, 其总菌数也相差无几。说明在碱性土壤环境条件下, 随着土壤 pH 的升高, 菌数下降。从海拔高度来看, 随着海拔的升高, 总的数量迅速下降。当海拔在 3800 米时, 放线菌数量明显低于其它样区。另外, 土壤类型、植被类型、植被状况等因素也是影响放线菌数量的关键因素。对中温菌, YIM-2 培养基所测的数量略高于高氏 1 号。对低温菌, 高氏 1 号培养基所测的菌数稍高于 YIM-2。

表 2 各样点土壤放线菌数量

Table 2 The numbers of actinomycetes in each sample site

Sample site	Mesophilic actinomycetes		Psychrophilic actinomycetes	
	/(10^3 /g dry wt)		/(10^2 /g dry wt)	
	Gauze No. 1	YIM-2	Gauze No. 1	YIM-2
	36.21	59.60	22.45	23.04
	44.06	56.23	23.29	24.33
	8.23	12.34	8.63	7.78
	61.31	82.17	22.72	24.53
	59.28	76.20	21.39	23.91
	32.67	38.50	13.24	13.82
	60.69	72.28	21.62	22.64

2.2 土壤放线菌区系组成

2.2.1 中温放线菌 (Mesophilic actinomycetes): 将从 7 个样区土样中所分离的放线菌进行分群归类 (表 3)。在 7 个样区中, 样区 分离到 4 个属, 链霉菌分离到 6 个类群, 其中除灰褐类群数量较高外, 其余均数量较低。样区 分离到 4 个属, 链霉菌分离到 4 个类群, 主要以黄色类群和灰褐类群占优势, 总的数量低于样区。样区 只分离到 2 个属, 链霉菌分离到 2 个类群, 组成单调, 且数量也很低。样区 的放线菌数量是所有样区中最高的, 分离到 4 个属, 链霉菌分离到 7 个类群, 组成比较复杂。样区 的放线菌数量仅次于样区, 其组成在所有样区中最复杂, 此样区分离到 5 个属, 链霉菌分离到 6 个类群, 总的数量居第三。样区 中分离到 4 个属, 链霉菌只分离到 2 个属, 组成较为简单, 数量只比样区高, 主要为黄色类群和诺卡氏菌。样区分离到 4 个属, 链霉菌分离到 6 个类群, 总数量居第三。

表 3 海北高寒草甸土壤放线菌区系

Table 3 Actinomycete populations in soil samples from Haibei alpine meadow

Genus							
Mesophilic actinomycetes/(10 ³ /g dry wt)							
<i>Streptomyces</i>							
Flavus	9.3	17.9	3.8	21.5	10.8	13.1	20.7
Griseofuscus	29.8	21.4	5.7	27.3	34.3	7.3	25.2
Lavendulae	1.7			3.9	2.4		
Albosporus	5.2	2.8		4.5	6.7		6.5
Globisporus	3.3	4.9		7.4	5.1		5.4
Roseosporus				1.2			2.1
Aureus	1.3			1.6	1.8		1.0
<i>Micromonospora</i>	1.7	3.2	2.8	4.8	3.1	3.9	4.1
<i>Nocardia</i>	7.2	4.6		6.3	8.5	12.9	5.1
<i>Saccharopolyspora</i>		1.1		3.6	2.9	1.4	2.2
<i>Promicromonospora</i>	0.2				0.6		
Sub-total	59.7	55.9	12.3	82.1	76.2	38.5	72.3
Psychrophilic actinomycetes/(10 ² /g dry wt)							
<i>Streptomyces</i>							
Aureus	12.3	3.5	1.4	7.3	5.1		6.5
Griseofuscus	11.4	12.4	6.5	9.6	11.6	8.2	10.6
Albosporus	5.7	3.7		2.5	3.3	2.1	
<i>Micromonospora</i>	2.2	2.1		3.8	2.8	3.4	4.2
<i>Nocardia</i>	1.5	0.3		0.9	1.2	2.7	0.9
<i>Saccharopolyspora</i>		0.5		1.3	1.1		1.3
Sub-total	33.1	22.5	7.9	25.4	25.1	16.4	23.5

海北高寒草甸土壤的链霉菌,主要以灰褐类群和黄色类群占优势;其余 5 个类群只在部分土样中分离到,数量也相对低。稀有放线菌只分离到 4 个属,即小单孢菌、诺卡氏菌和糖多孢菌和原小单孢菌。原小单孢菌只在金露梅灌丛土壤中分离到。从不同土壤看来,高山灌丛草甸土、高山草甸土壤的放线菌组成较为复杂,分离到的放线菌属较为丰富;而高山冻漠土、藏嵩草沼泽草甸土和小嵩草高山草甸土壤的放线菌组成较为简单。由于高寒草甸生态系统地处高海拔地区,长期低温、强紫外线辐射、土壤碱性反应、干旱等缘故,与国内其它高寒山区土壤的

放线菌区系组成相比^[12],海北高寒草甸生态系统土壤的放线菌区系组成非常简单,数量也明显低。

2.2.2 低温放线菌(Psychrophilic actinomycetes):在高寒草甸土壤中,低温菌只分离到 4 个属。其中链霉菌以灰褐类群和金色类群占优势,白孢类群只在部分土样中分离到,数量也低。稀有放线菌中,小单孢菌的数量相对较高,其分布也较广;诺卡氏菌和糖多孢菌数量较低(表 3)。

2.3 酶活性及拮抗性测定

从分离到的放线菌中选取 230 株中温放线菌和 110 株低温放线菌进行淀粉水解、纤维素利用、硝酸

表 4 放线菌生理生化特性

Table 4 The physiological and biochemical characteristics of tested actinomycetes

Item	Mesophilic actinomycetes						Psychrophilic actinomycetes					
	A	B	C	D	Total	Positive/ %	A	B	C	D	Total	Positive/ %
Number of strains tested	120	40	40	30	230	100	75	20	5	10	110	100
Starch decomposition	45	4	1	1	51	22.2	14		1		15	13.6
Cellulose utilization	7	1		3	11	4.8	53	4	2	5	64	58.2
Nitrate deoxidization	16	4	21		41	17.8						
Lysozyme	12				12	5.2	5				5	4.5
Milkclotting enzyme	8				8	3.5	7				7	6.4
Gelatin												
Growth	63	3	17	14	97	42.2	68	3	4	8	83	75.5
Liquefaction	25				25	10.9	21				21	19.1
Antimicrobial activity against												
<i>B. subtilis</i>	22	5	6		33	14.3	4				4	3.6
<i>E. coli</i>	9	1	2		12	5.2	1				1	0.9
<i>Penicillium</i> sp.	4				4	1.7						
<i>Mucor</i> sp.	1				1	0.4	1				1	0.9
Mycolis acids	-	-	+	-			-	-	+	-		

A: *Streptomyces*; B: *Micromonospora*; C: *Nocardia*; D: *Saccharopolyspora*.

盐还原等酶活性测定及拮抗性试验。结果表明(表4),部分链霉菌株表现出酶活性和抗菌活性,其中有22株链霉菌对革兰氏阳性菌有抗性,9株对革兰氏阴性菌有抗性,对真菌的拮抗性只出现5株次。稀有放线菌的酶反应和抗菌活性阳性率很低,未出现对真菌有抗性的菌株。

参 考 文 献

- [1] 刘志恒,阮继生,阎逊初. 北里孢菌属的一个新种. 微生物学报,1986,26(1):87-89.
- [2] 刘兴荔,连云鹏. 小多孢菌科的一个新属. 微生物学报,1986,26(1):7-10.
- [3] 徐尚志. 小双孢菌属的一个新变种. 微生物学报,1986,25(4):363-365.
- [4] 邓宇秀,阎逊初. 小单孢菌属分类的研究. 小单孢菌属的一个新种. 微生物学报,1985,25(1):79-80.
- [5] 王来福,宋尚直,阮继生. 盐碱放线菌的分类研究. 微生物学报,1993,33(6):393-399.
- [6] Nonomura H. Studies on isolation, taxonomy and ecology of soil actinomycetes. *Actinomycetologica*, 1989, 3: 45.
- [7] Goodfellow M, Cross T. The biology of the actinomycetes. London: Academic press, 1984.
- [8] Okami Y. Concepts and techniques for isolation and characterization of actinomycetes. In: SIM-ISA '91 workshop on Actinomycetes. Madison: University of Wisconsin, 1991, 1-3.
- [9] Hayakawa M. Selective isolation method and distribution of soil actinomycetes. *Actinomycetologica*, 1990, 4: 95.
- [10] 姜成林,徐丽华. 哀牢山土壤放线菌组成的研究. 指孢囊菌属的鉴定. 微生物学报,1985,25(1):19-24.
- [11] 姜成林,徐丽华,谢桂兰. 云南若干地区土壤放线菌区系和资源考察. 来自不同生态环境的小单孢菌和链霉菌的细胞壁组成. 微生物学报,1986,26(3):206-209.
- [12] 姜成林,徐丽华,郭光远. 云南若干地区土壤放线菌区系及资源考察. 高寒山区的放线菌. 微生物学报,1988,28(3):198-205.
- [13] 徐丽华,姜成林. 云南若干地区土壤放线菌区系及资源考察. 西双版纳地区土壤放线菌区系及资源考察. 微生物学报,1987,27(2):173-177.
- [14] 刘德容,赵益善,郭 翥,等. 山西蟒河自然保护区土壤放线菌区系及资源调查. 微生物学通报,1998,25(1):1-5.
- [15] 刘德容,李晓虹. 山西运城盐湖放线菌区系研究. 微生物学报,1998,38(2):137-141.
- [16] 冯清平. 灰色链霉菌的一个新亚种. 微生物学报,1988,28(1):82-84.
- [17] 张国伟,邢桂香,阎逊初,等. 链霉菌属中的两个新变种. 微生物学报,1986,26(2):101-104.
- [18] 周新民. 中国嵩草草甸. 北京:科学出版社,2001.
- [19] 姜成林,徐丽华. 微生物资源学. 北京:科学出版社,1997.
- [20] 杨宇容,徐丽华,段若玲,等. 稀有放线菌分离方法的研究. 云南大学学报(自然科学版),1997,19(4):403-408.
- [21] 阮继生. 放线菌分类基础. 北京:科学出版社,1977.
- [22] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京:科学出版社,1975.
- [23] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2001.
- [24] 王 平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法. 微生物学通报,1986,13(5):228-231.

Study on Actinomycetes Population of Alpine Meadow Soil in Qinghai

WANG Qi-Lan* CAO Guang-Min JIANG Wen-Bo ZHANG Yao-Sheng

(Northwest Plateau Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China)

Abstract: Soil samples were collected from six kinds of soil in Haibei alpine meadow ecosystem during 2001~2002. More than 300 strains of actinomycete were isolated by five agar media. On the basis of morphological characteristics and some chemotaxonomic properties, the isolated strains were classified into different genera, such as *Micromonospora*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora*, *Promicromonospora*, *Streptomyces*, and the *Streptomyces* strains were classified into seven groups. The result indicated that the biodiversity of actinomycetes in different soils and the actinomycetes abundance of different kinds showed significant differences. The activities of some enzymes produced by mesophilic and psychophilic actinomycetes also discussed in this paper. It is found that many strains of streptomyces not only have some enzyme activities such as starch decomposition, nitrate deoxidization, gelatin utilization etc., but also have some inhibiting activities for fungi and bacteria offered to test, whereas the rare actinomyces showed low positive rate of enzyme activities and inhibiting activities for fungi and bacteria.

Key words: Alpine meadow, Actinomycete population, Actinomycete resources

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (40471133)

*Corresponding author. Tel: 86-971-6101116; Fax: 86-971-6143282; E-mail: wql@nwipb.ac.cn

Received date: 03-15-2004