

太白山土壤放线菌分离方法及生态分布规律

王 鹤, 彭 楚, 来航线, 韦小敏, 姜影影

(西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 研究了改良高氏培养基、甘油-天门冬酰胺培养基、R2A 培养基、改良高氏二号培养基、海藻糖-脯氨酸培养基对太白山不同植被土壤放线菌的分离效果, 并分析放线菌的生态分布规律。结果表明: 太白山南北坡土壤养分大体呈现为中海拔林地含量相对较高, 有机质和全氮含量最高分别为 $77.81 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $5.35 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 低海拔林地与高海拔林地含量相对较低, 有机质和全氮含量最低分别为 $11.77 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $0.85 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 即自低海拔至高海拔不同林地类型土壤养分整体呈现先升高后降低的趋势; 甘油-天门冬酰胺培养基分离的放线菌数量与种类均高于其它培养基, 其数量最高可达 $258 \times 10^4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 土, 种类最多为 35 种; 改良高氏培养基分离南坡的效果优于北坡; R2A 培养基分离中高海拔林地土壤优势更明显。中海拔林地类型, 如北坡的红皮桦、牛皮桦, 南坡的牛皮桦, 分离的放线菌数量均显著高于其它林地类型; 土壤速效磷和全氮含量对放线菌的分离效果影响较大。

关键词: 土壤养分; 放线菌; 分离方法; 生态分布; 太白山

中图分类号: S154.3 文献标志码: A

Study on method of actinomycetes isolation from soils of Taibai mountain and its ecological distribution

WANG He, PENG Chu, LAI Hang-xian, WEI Xiao-min, JIANG Ying-ying

(College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The study explored the method of actinomycetes isolation from soils of Taibai mountain through five medias, including modification No. 1 media, glycerin-asparagine media, R2A media, modification No. 2 media and trehalose-proline media, and analyse its ecological distribution. The result showed that, soil nutrient of Taibai mountain on both north and south slope presented a relatively high concentration in mid-elevation forest type, the maximum concentration of organic matter and total nitrogen was $77.81 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $5.35 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively, a relatively low concentration in the both sites of altitude, organic matter and total nitrogen concentration were lowest at $11.77 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $0.85 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively, which means from low to high elevation in different forest types soil nutrient presented a trend of reducing then rising as a whole; Analysis of actinomycetes number and variety on different soils of plant types showed that modification glycerin-asparagine media was apparently higher than that from others, with the quantity of $258 \times 10^4 \text{ cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ soil, 35 species kinds, Modification No. 1 media showed a better separation effect on the south slope, which mean more suitable for the separation of the south slope of different forest soil actinomycetes. There are obvious advantages of R2A media while isolating mid-elevation forest type. Mid-elevation forest type, such as red birch, betula utilise in north slope, betula utilise in south slope, represented a significant difference than other types on the number of isolated actinomycetes. Soil available phosphorus and total nitrogen concentration had a greater influence on the number and variety isolated from soils, slope affected the correlation between isolation result and soil nutrients.

Keywords: soil nutrient; actinomycetes; isolation method; ecological distribution; Taibai mountain

放线菌是微生物中与人类关系非常密切且有实用价值的一类菌, 以其较强的次级代谢产物能力而为人们所熟知, 可作为抗生素、维生素、酶和酶抑制

剂的产生菌, 是一类具有实际价值的微生物资源。迄今为止, 微生物产生的 2 万多种生物活性物质中有超过一半都是由放线菌产生的, 而且目前广泛应

用的抗生素约 70% 也是由放线菌产生。这些抗生素的发现和ación不仅对人类健康起着不可替代的作用,还给人们带来了巨大的经济效益^[1]。目前,关于放线菌资源的研究主要集中在现有物种中新活性物质的开发以及新物种的分离两个方面。

秦岭是我国自然地理和气候的南北分界线。太白山是秦岭主峰,最高海拔 3 767 m^[2]。太白山以其巨大的高山落差,形成了独有的垂直气候带,自下而上分布着暖温带、温带、高山寒温带、高山亚寒带及高山寒带 5 个明显的气候带^[3]。其植被类型及土壤类型差异明显,水热条件迥异,是理想的放线菌分离源。但目前对放线菌的研究主要集中在北坡,对南坡以及南北坡综合比较研究较少。

本研究选用太白山南北坡不同海拔高度的 13 个典型植被土壤为研究材料,通过设计不同养分的

培养基研究不同林地类型土壤放线菌分离效果,得到适合不同林地及不同坡向的培养基;并分析太白山不同林地放线菌生态分布规律,旨在为后续不同林地类型放线菌分离培养基选择提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 土壤样品 13 种供试土样采自秦岭主峰太白山(33°52'88" ~ 34°04'22"N, 107°41'86" ~ 107°49'00"E)。选取 5 个采样点进行采样,去除表面的枯枝落叶层及腐殖层,采集其下的土层,充分混合后四分法取土,装入无菌塑封袋中。将样品带回实验室后,土样自然风干 20 d,研磨过 1 mm 筛,装入塑封袋中备用。供试土壤样品采集点的环境条件见表 1。

表 1 供试土壤采集点的环境条件

Table 1 Environmental conditions of soil sampling sites

样号 Samples number	坡向 Slope	海拔/m Altitude	林地类型 Forest type	土壤类型 Soil type
2	北坡 North	1618	锐齿栎纯林 <i>Quercus aliena</i> var. <i>acuteserrata</i>	棕壤 Brown soil
5	北坡 North	1963	辽东栎纯林 <i>Quercus liaotungensis</i> Koidz	棕壤 Brown soil
9	北坡 North	2526	红皮桦纯林 <i>Betula albosinensis</i> Burk	暗棕壤 Dark brown soil
12	北坡 North	2732	牛皮桦纯林 <i>Betula albosinensis</i> var. <i>septentrionalis</i>	暗棕壤 Dark brown soil
16	北坡 North	2969	巴山冷杉纯林 <i>Abies fargesii</i> Franch	暗棕壤 Dark brown soil
19	北坡 North	3359	太白红杉纯林 <i>Larix chinensis</i> Beissn	森林草甸土 Forest meadow soil
22	顶峰 Top	3738	高山草甸 Alpine meadow	高山草甸土 Alpine meadow soil
23	南坡 South	3574	高山灌丛 Alpine scrub	亚高山草甸土 Subalpine meadow soil
25	南坡 South	3202	太白红杉纯林 <i>Larix chinensis</i> Beissn	森林草甸土 Forest meadow soil
28	南坡 South	2785	巴山冷杉纯林 <i>Abies fargesii</i> Franch	暗棕壤 Dark brown soil
31	南坡 South	2442	牛皮桦纯林 <i>Betula albosinensis</i> var. <i>septentrionalis</i>	棕壤 Brown soil
33	南坡 South	2254	红皮桦纯林 <i>Betula albosinensis</i> Burk	棕壤 Brown soil
37	南坡 South	1708	锐齿栎纯林 <i>Quercus aliena</i> var. <i>acuteserrata</i>	棕壤 Brown soil

1.1.2 培养基

(1) 改良高氏培养基^[4](G):可溶性淀粉 15.0 g,腐殖酸 0.5 g,硝酸钾 1 g,磷酸氢二钾 0.5 g,硫酸镁 0.5 g,七水合硫酸亚铁 0.02 g,维生素族 0.5 mg,琼脂 15 g, pH 7.2 ~ 7.4, 自来水 1 000 mL。(维生素族:维生素 B1、核黄素、烟酸、维生素 B6、泛酸钙、肌醇、P-氨基苯甲酸各 0.5 mg,生物素 0.25 mg,下同)

(2) 甘油-天门冬酰胺培养基^[5](L):L-天门冬酰胺 1 g,甘油 10 g,磷酸氢二钾 0.5 g,微盐溶液 1 mL,琼脂 15 g, pH 7.2, 自来水 1 000 mL。

(3) R2A 培养基^[6](R):酵母粉 0.5 g,胰蛋白胨 0.25 g,蛋白胨 0.75 g,葡萄糖 0.5 g,淀粉 0.5 g,磷酸氢二钾 0.3 g,硫酸镁 0.024 g,丙酮酸钠 0.3 g,琼

脂 15 g, pH 7.2, 自来水 1 000 mL。

(4) 改良高氏二号培养基^[7](E):葡萄糖 1 g,蛋白胨 0.5 g,胰胨 0.3 g,氯化钠 0.5 g,复合维生素 0.5 mg,琼脂 15 g, pH 7.2, 自来水 1 000 mL。

(5) 海藻糖-脯氨酸培养基^[7](D):海藻糖 5 g,脯氨酸 1 g,硫酸铵 1 g,氯化钠 1 g,氯化钙 2 g,磷酸氢二钾 1 g,硫酸镁 1 g,复合维生素 0.5 mg,琼脂 15 g, pH 7.2, 自来水 1 000 mL。

纯化培养基统一采用改良高氏培养基。

1.1.3 抑制剂 5 种分离培养基抑制剂均选用重铬酸钾,浓度为 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤养分含量的测定 土壤养分测定参照

《土壤农化分析》^[8],其中 pH 采用 pH 计测量,有机质采用重铬酸钾外加热氧化法测定,全氮采用凯氏定氮法测定,速效氮采用流动分析仪法测定,速效磷采用 NaHCO₃ 浸提-钼锑抗比色法测定,速效钾采用 NH₄OAc 浸提,火焰光度计法测定。

1.2.2 放线菌的分离及培养 采用稀释平板涂布法进行分离^[9]。分别称取 5.0 g 供试土样加入装有 45 mL 无菌水的三角瓶中,180 r·min⁻¹ 震荡 30 min 进行 10⁻¹ 稀释,依次吸取 1.0 mL 加入 9.0 mL 无菌水中做 10⁻²、10⁻³ 稀释。分别吸取 0.1 mL 10⁻²、10⁻³ 两个稀释度的样品悬液涂布于 5 种分离培养基

上,置于 28℃ 培养 15 d,将培养皿中形态明显不同的菌落视为不同种类,对其数量及种类进行统计;将菌株接入改良高氏斜面,28℃ 培养 7 d 保存。

1.3 数据分析

采用 SAS 9.0 对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同林地类型土壤养分特征

土壤养分含量对微生物的构成意义重大。对 13 个土样的部分养分含量进行分析,结果见表 2。

表 2 太白山不同植被土壤基本理化性质

Table 2 Basic chemical properties of the soil samples on Taibai mountain

林地类型 Forest type	坡向 Slope	pH	有机质 Organic matter /(g·kg ⁻¹)	全氮 Total nitrogen /(g·kg ⁻¹)	铵态氮 NH ₄ ⁺ - N /(mg·kg ⁻¹)	硝态氮 NO ₃ ⁻ - N /(mg·kg ⁻¹)	速效磷 Available phosphorus /(mg·kg ⁻¹)	速效钾 Available potassium /(mg·kg ⁻¹)
锐齿栎 <i>Quercus aliena</i> var. <i>acuteserrata</i>	北坡 North	5.07 ± 0.33d	23.85 ± 0.50f	0.85 ± 0.07e	2.13 ± 0.03g	10.42 ± 0.20a	3.59 ± 0.16b	87.11 ± 1.43d
辽东栎 <i>Quercus liaotungensis</i> Koidz	北坡 North	5.74 ± 0.06c	41.26 ± 0.70de	2.24 ± 0.14b	3.35 ± 0.20f	8.70 ± 0.03b	4.05 ± 0.16a	50.42 ± 1.00e
红皮桦 <i>Betula albosinensis</i> Burk	北坡 North	6.22 ± 0.28abc	54.24 ± 0.39b	1.82 ± 0.03c	4.55 ± 0.07e	7.65 ± 0.26c	3.98 ± 0.25a	123.64 ± 4.32c
牛皮桦 <i>Betula albosinensis</i> var. <i>septentrionalis</i>	北坡 North	6.55 ± 0.31a	40.58 ± 0.67e	1.12 ± 0.04d	5.61 ± 0.15c	3.15 ± 0.39f	2.90 ± 0.2d	145.75 ± 0.41b
巴山冷杉 <i>Abies fargesii</i> Franch	北坡 North	6.42 ± 0.52ab	77.58 ± 2.26a	2.81 ± 0.06a	9.63 ± 0.42a	7.41 ± 0.22c	2.58 ± 0.05f	242.31 ± 1.22a
太白红杉 <i>Larix chinensis</i> Beissn	北坡 North	6.58 ± 0.29a	47.98 ± 0.45c	1.87 ± 0.11c	4.85 ± 0.12d	6.54 ± 0.27d	3.14 ± 0.13c	124.17 ± 1.04c
高山草甸 Alpine meadow	北坡 North	5.96 ± 0.35bc	45.90 ± 0.33cd	1.67 ± 0.03c	6.19 ± 0.03b	5.97 ± 0.20e	2.69 ± 0.09e	63.65 ± 1.78e
锐齿栎 <i>Quercus aliena</i> var. <i>acuteserrata</i>	南坡 South	5.68 ± 0.27c	11.77 ± 1.46d	1.89 ± 0.09d	2.20 ± 0.22g	3.49 ± 0.23g	3.95 ± 0.26b	95.45 ± 1.08e
红皮桦 <i>Betula albosinensis</i> Burk	南坡 South	6.41 ± 0.09a	51.03 ± 0.40c	4.26 ± 0.25b	11.93 ± 0.22a	7.09 ± 0.22d	7.15 ± 0.45a	187.82 ± 0.39b
牛皮桦 <i>Betula albosinensis</i> var. <i>septentrionalis</i>	南坡 South	6.33 ± 0.21a	65.77 ± 1.21b	4.30 ± 0.13b	11.65 ± 0.30b	6.62 ± 0.31e	3.14 ± 0.17e	145.10 ± 1.70d
巴山冷杉 <i>Abies fargesii</i> Franch	南坡 South	6.03 ± 0.14b	64.13 ± 1.41b	5.35 ± 0.08a	8.70 ± 0.40c	9.49 ± 0.3b	3.59 ± 0.34bc	84.62 ± 1.59f
太白红杉 <i>Larix chinensis</i> Beissn	南坡 South	5.79 ± 0.11c	45.55 ± 2.34c	2.13 ± 0.19c	4.54 ± 0.08f	12.06 ± 0.54a	3.56 ± 0.26cd	202.38 ± 0.95a
高山灌丛 Alpine scrub	南坡 South	6.25 ± 0.04a	77.81 ± 1.27a	0.89 ± 0.06f	5.27 ± 0.09e	7.85 ± 0.27c	3.20 ± 0.22de	174.21 ± 1.11c
高山草甸 Alpine meadow	南坡 South	5.96 ± 0.35bc	45.90 ± 0.33c	1.67 ± 0.03e	6.19 ± 0.03d	5.97 ± 0.20f	2.69 ± 0.09f	63.65 ± 1.78g

注:同列所标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column refer to significant difference at $P < 0.05$.

由表 2 知,太白山北坡供试土壤 pH 值为 5.07 ~ 6.58,太白红杉和牛皮桦显著高于其它植物,锐齿栎最低;有机质含量介于 23.85 ~ 77.58 g·kg⁻¹,巴山冷杉土壤的有机质含量显著高于其它植物,锐齿栎土壤最低;全氮含量介于 0.85 ~ 2.81 g·kg⁻¹,其

中巴山冷杉土壤的全氮含量显著高于其它植物,辽东栎次之,锐齿栎土壤最低;铵态氮含量介于 2.13 ~ 9.63 mg·kg⁻¹,巴山冷杉、高山草甸、红皮桦、太白红杉、红皮桦、辽东栎、锐齿栎差异显著;硝态氮含量介于 3.42 ~ 10.15 mg·kg⁻¹,其中锐齿栎土壤硝态氮

含量显著高于其它植物,辽东栎次之,牛皮桦土壤最低;速效磷含量介于 $2.69 \sim 4.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其中辽东栎和红皮桦土壤显著高于其它植物,锐齿栎、太白红杉、牛皮桦、高山草甸差异显著;速效钾含量介于 $50.42 \sim 242.31 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其中巴山冷杉土壤的速效磷含量显著高于其它植物,牛皮桦次之,高山草甸和辽东栎土壤最低。综合各类指标,巴山冷杉土壤肥力最高,锐齿栎和高山草甸最低。

由表 2 还可知,太白山南坡供试土壤 pH 值介于 $5.68 \sim 6.41$,红皮桦、牛皮桦和高山灌丛显著高于其它植物,高山草甸、太白红杉和锐齿栎含量最低;有机质含量介于 $11.77 \sim 77.81 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,高山灌丛土壤的有机质含量显著高于其它植物,锐齿栎土壤最低;全氮含量介于 $0.89 \sim 5.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,巴山冷杉土壤的全氮含量显著高于其它植物,红皮桦和牛皮桦基本持平,太白红杉、锐齿栎、高山草甸、高山灌丛差异显著;铵态氮含量介于 $2.20 \sim 11.93 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,红皮桦、牛皮桦、巴山冷杉、高山草甸、高山灌丛、太白红杉、锐齿栎差异显著;硝态氮含量介于 $3.49 \sim 12.06 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,太白红杉、巴山冷杉、高山灌丛、红皮桦、牛皮桦、高山草甸、锐齿栎差异显著;速效磷含量介于 $2.69 \sim 7.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其中红皮桦土壤显著高于其它植物,高山草甸土壤最低;速效钾含量介于 $63.65 \sim 202.38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,太白红杉、红皮桦、高山灌丛、牛皮桦、锐齿栎、巴山冷杉、高山草甸差异显著。

综合各类指标,太白红杉和牛皮桦肥力较高,锐齿栎和高山草甸最低。

综合比较南北坡养分含量可知,南坡 pH 值为 $5.68 \sim 6.41$,北坡 pH 含量为 $5.07 \sim 6.58$,北坡变幅比南坡大,北坡最低 pH 为 5.07 ;有机质含量差异较大,最大为 $77.81 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,最小为 $11.77 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;南坡供试土壤全氮含量最高为 $5.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,北坡仅为 $2.81 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,南坡土壤全氮含量高于北坡;硝铵态氮含量南北坡差异不大;速效磷含量南坡最高值为 $7.15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,北坡最高值为 $4.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,南坡土壤速效磷含量高于北坡;速效钾含量南北坡基本持平。整体而言,太白山南北坡土壤养分大体呈现中海拔林地含量相对较高,如巴山冷杉,低海拔林地与高海拔林地含量相对较低,如锐齿栎和高山草甸,即自低海拔至高海拔不同林地类型土壤养分整体呈现先升高后降低的趋势。且南坡的土壤养分含量较北坡高,这可能是由于南坡光照充足,温度较高,水热条件更有利于微生物活动,因而促进了养分积累。

2.2 不同培养基放线菌分离效果

培养基直接为放线菌提供生长繁殖所必需的各种碳源、氮源、无机盐及生长因子等,不同放线菌种类对营养物质的需求不同。采用 5 种培养基对太白山南北坡海拔高度不同的 13 种典型林地土壤中的放线菌进行了分离,分离效果见表 3,表 4。

表 3 5 种培养基分离的放线菌数量/ $(10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1})$

Table 3 Isolated soil actinomycete quantity in five kinds of culture medium

林地类型 Forest type	坡向 Slope	G	L	R	E	D
锐齿栎 <i>Quercus aliena</i> var. <i>acuteserrata</i>	北坡 North	$138.0 \pm 2.0\text{b}(\text{b})$	$185.5 \pm 4.5\text{b}(\text{a})$	$123.0 \pm 2.0\text{c}(\text{b})$	$131.0 \pm 0.0\text{d}(\text{b})$	$6.5 \pm 0.5\text{a}(\text{c})$
辽东栎 <i>Quercus liaotungensis</i> Koidz	北坡 North	$139.5 \pm 2.5\text{b}(\text{b})$	$164.0 \pm 3.0\text{b}(\text{a})$	$127.0 \pm 2.0\text{c}(\text{b})$	$142.0 \pm 1.0\text{b}(\text{b})$	$2.0 \pm 1.0\text{b}(\text{c})$
红皮桦 <i>Betula albosinensis</i> Burk	北坡 North	$242.5 \pm 3.5\text{a}(\text{a})$	$258.0 \pm 5.0\text{a}(\text{a})$	$239.5 \pm 1.5\text{a}(\text{a})$	$238.5 \pm 0.5\text{a}(\text{a})$	$3.5 \pm 0.5\text{b}(\text{b})$
牛皮桦 <i>Betula albosinensis</i> var. <i>septentrionalis</i>	北坡 North	$133.5 \pm 0.5\text{b}(\text{b})$	$151.0 \pm 2.0\text{b}(\text{a})$	$152.0 \pm 1.0\text{b}(\text{a})$	$135.0 \pm 1.0\text{c}(\text{b})$	$7.0 \pm 1.0\text{a}(\text{c})$
巴山冷杉 <i>Abies fargesii</i> Franch	北坡 North	$11.0 \pm 1.0\text{c}(\text{ab})$	$19.0 \pm 3.0\text{c}(\text{a})$	$22.5 \pm 1.5\text{e}(\text{a})$	$14.0 \pm 1.0\text{e}(\text{ab})$	$1.5 \pm 0.5\text{b}(\text{b})$
太白红杉 <i>Larix chinensis</i> Beissn	北坡 North	$22.5 \pm 2.5\text{c}(\text{ab})$	$22.5 \pm 2.5\text{c}(\text{ab})$	$35.5 \pm 0.5\text{d}(\text{a})$	$15.0 \pm 1.0\text{e}(\text{bc})$	$6.0 \pm 0.0\text{a}(\text{c})$
高山草甸 Alpine meadow	北坡 North	$9.5 \pm 0.5\text{c}(\text{a})$	$10.0 \pm 1.0\text{c}(\text{a})$	$7.0 \pm 1.0\text{f}(\text{b})$	$6.5 \pm 0.5\text{f}(\text{b})$	$2.5 \pm 0.5\text{b}(\text{c})$
锐齿栎 <i>Quercus aliena</i> var. <i>acuteserrata</i>	南坡 South	$118.5 \pm 0.5\text{c}(\text{a})$	$147.0 \pm 2.0\text{b}(\text{a})$	$118.5 \pm 2.5\text{b}(\text{a})$	$114.5 \pm 4.5\text{a}(\text{a})$	—
红皮桦 <i>Betula albosinensis</i> Burk	南坡 South	$140.5 \pm 0.5\text{b}(\text{a})$	$130.5 \pm 0.5\text{c}(\text{b})$	$113.5 \pm 1.5\text{b}(\text{c})$	$140.5 \pm 1.5\text{a}(\text{a})$	—
牛皮桦 <i>Betula albosinensis</i> var. <i>septentrionalis</i>	南坡 South	$229.0 \pm 2.0\text{a}(\text{a})$	$225.5 \pm 1.5\text{a}(\text{a})$	$218.0 \pm 1.0\text{a}(\text{a})$	$115.0 \pm 2.0\text{a}(\text{b})$	—
巴山冷杉 <i>Abies fargesii</i> Franch	南坡 South	$99.5 \pm 2.5\text{d}(\text{a})$	$128.0 \pm 1.0\text{c}(\text{a})$	$114.0 \pm 2.0\text{b}(\text{a})$	$96.5 \pm 6.5\text{b}(\text{a})$	—
太白红杉 <i>Larix chinensis</i> Beissn	南坡 South	$39.0 \pm 2.0\text{e}(\text{c})$	$81.5 \pm 0.5\text{d}(\text{b})$	$92.5 \pm 0.5\text{c}(\text{a})$	$29.5 \pm 1.5\text{c}(\text{c})$	—
高山灌丛 Alpine scrub	南坡 South	$15.5 \pm 3.5\text{f}(\text{a})$	$20.5 \pm 0.5\text{e}(\text{a})$	$19.5 \pm 2.5\text{d}(\text{a})$	$18.5 \pm 0.5\text{c}(\text{a})$	—
高山草甸 Alpine meadow	南坡 South	$9.5 \pm 0.5\text{g}(\text{a})$	$10.0 \pm 1.0\text{f}(\text{a})$	$7.0 \pm 1.0\text{d}(\text{b})$	$6.5 \pm 0.5\text{c}(\text{b})$	—

注:同列所标(括号外)及同行所标(括号内)不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

Note: Different letters out of (in) the brackets in the same column (line) refer to significant difference at $P < 0.05$. The same as below.

2.2.1 放线菌数量 由表3分析北坡放线菌数量可知,甘油-天门冬酰胺培养基(L)分离锐齿栎、辽东栎、红皮桦和高山草甸土壤中放线菌的效果明显优于其它培养基,数量最高可达 $258 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 土,分离牛皮桦与R2A培养基(R)相当,而分离巴山冷杉、太白红杉土壤中放线菌效果略低于R2A(R);R2A培养基(R)除在分离锐齿栎和辽东栎效果低于其它培养基,在其它土壤类型放线菌的分离效果都优于或与其它培养基持平;改良高氏(G)和改良高氏二号(E)分离效果表现一般;海藻糖-脯氨酸(D)分离效果不佳,仅为 $2.0 \sim 7.0 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 土,但该培养基主要用于分离稀有放线菌,数量不占优属正常。5种培养基中,甘油-天门冬酰胺培养基(L)分离放线菌数效果最好,R2A培养基(R)次之,海藻糖-脯氨酸培养基(D)最差。

由表3分析南坡可知,改良高氏培养基(G)分离红皮桦土壤放线菌的数量与改良高氏二号培养基(E)相近,并显著高于其它培养基,在分离高山草甸

土壤放线菌时甘油-天门冬酰胺培养基(L)效果最好,并显著高于其它培养基;甘油-天门冬酰胺培养基(L)分离高山草甸土壤效果最好;R2A培养基(R)分离太白红杉土壤中放线菌的效果明显优于其它培养基;海藻糖-脯氨酸培养基(D)分离时污染严重,故未作分析。5种培养基中,改良高氏(G)和甘油-天门冬酰胺培养基(L)分离放线菌数效果最好,R2A培养基(R)较好。

综合分析南北坡分离的放线菌数量可知,甘油-天门冬酰胺培养基(L)分离放线菌效果最好,数量最高可达 $258 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 土;R2A培养基(R)次之,该培养基在中海拔以上的分离效果优势更明显;改良高氏培养基(G)在南坡分离放线菌的数量明显高于北坡;改良高氏二号培养基(E)整体表现一般。不同培养基分离放线菌数量差别可能与培养基本身养分构成有关,同时受海拔高度、光照及温度、植被类型、土壤养分等影响。

表4 5种培养基分离的放线菌种类数

Table 4 Numbers of isolated soil actinomycete types on five kinds of culture medium

林地类型 Forest type	坡向 Slope	G	L	R	E	D
锐齿栎 <i>Quercus aliena</i> var. <i>acuteserrata</i>	北坡 North	25.0 ± 0.0a(b)	30.5 ± 0.5ab(a)	20.0 ± 1.0a(c)	25.0 ± 1.0a(b)	2.5 ± 0.5ab(d)
辽东栎 <i>Quercus liaotungensis</i> Koidz	北坡 North	25.0 ± 1.0a(b)	35.0 ± 1.0a(a)	25.0 ± 1.0a(b)	23.5 ± 1.5ab(b)	2.0 ± 1.0b(c)
红皮桦 <i>Betula albosinensis</i> Burk	北坡 North	15.5 ± 0.5b(b)	22.5 ± 0.5c(a)	26.0 ± 3.0a(a)	19.5 ± 0.5b(a)	2.0 ± 0.0b(c)
牛皮桦 <i>Betula albosinensis</i> var. <i>septentrionalis</i>	北坡 North	12.0 ± 1.0c(b)	21.0 ± 0.0c(a)	17.5 ± 1.5a(a)	12.0 ± 1.0c(b)	3.5 ± 0.5a(c)
巴山冷杉 <i>Abies fargesii</i> Franch	北坡 North	10.5 ± 0.5c(ab)	14.5 ± 0.5d(a)	14.5 ± 1.5a(a)	8.0 ± 1.0cd(b)	1.5 ± 0.5b(c)
太白红杉 <i>Larix chinensis</i> Beissn	北坡 North	24.0 ± 1.0a(a)	28.5 ± 2.5b(b)	16.5 ± 1.5a(ab)	12.5 ± 0.5c(bc)	3.0 ± 0.0a(c)
高山草甸 Alpine meadow	北坡 North	9.0 ± 1.0c(b)	15.5 ± 0.5cd(a)	8.5 ± 0.5b(b)	5.0 ± 1.0d(c)	2.5 ± 0.5ab(d)
锐齿栎 <i>Quercus aliena</i> var. <i>acuteserrata</i>	南坡 South	20.0 ± 1.0ab(a)	24.0 ± 3.0a(a)	23.5 ± 0.5a(a)	10.0 ± 1.0b(a)	—
红皮桦 <i>Betula albosinensis</i> Burk	南坡 South	13.0 ± 1.0b(b)	22.5 ± 1.5ab(a)	16.0 ± 1.0c(ab)	17.0 ± 1.0a(ab)	—
牛皮桦 <i>Betula albosinensis</i> var. <i>septentrionalis</i>	南坡 South	18.0 ± 1.0b(a)	16.5 ± 0.5abc(ab)	15.5 ± 0.5c(b)	8.5 ± 0.5bc(c)	—
巴山冷杉 <i>Abies fargesii</i> Franch	南坡 South	14.5 ± 0.5a(b)	19.5 ± 0.5abc(a)	20.0 ± 1.0b(a)	11.0 ± 0.0b(c)	—
太白红杉 <i>Larix chinensis</i> Beissn	南坡 South	17.0 ± 1.0b(a)	13.5 ± 0.5c(a)	16.0 ± 1.0c(a)	12.0 ± 2.0ab(a)	—
高山灌丛 Alpine scrub	南坡 South	10.0 ± 1.0a(b)	15.5 ± 0.5bc(a)	12.0 ± 1.0d(b)	10.5 ± 0.5bc(b)	—
高山草甸 Alpine meadow	南坡 South	9.0 ± 1.0ab(b)	15.5 ± 0.5bc(a)	8.5 ± 0.5e(b)	5.0 ± 1.0c(c)	—

2.2.2 放线菌种类 由表4分析北坡可知,甘油-天门冬酰胺(L)培养基分离锐齿栎、辽东栎和高山草甸土壤放线菌的效果明显优于其它培养基,分离红皮桦、牛皮桦、巴山冷杉土壤放线菌的效果与R2A(R)培养基相当,为35种;R2A培养基(R)除分离锐齿栎土壤放线菌效果劣于其它培养基外,对其它类型土壤放线菌的分离效果优于或等于其它培养基;改良高氏(G)和改良高氏二号(E)培养基分离效果不明显;海藻糖-脯氨酸(D)培养基分离放线菌种类较少,但该培养基主要用于分离稀有放线菌,分离

种类数上不占优属正常,且其得到的放线菌形态观察较特别。5种培养基中,甘油-天门冬酰胺培养基(L)分离放线菌种类最多,R2A培养基(R)次之。

由表4,分析南坡放线菌种类可知,甘油-天门冬酰胺(L)培养基分离高山灌丛和高山草甸土壤中放线菌的效果明显优于其它培养基,分离锐齿栎、巴山冷杉、太白红杉土壤放线菌的效果与R2A(R)培养基相当;R2A(R)和改良高氏(G)培养基的分离效果基本一致,改良高氏二号(E)培养基的分离效果不佳,海藻糖-脯氨酸(D)分离过程霉菌污染严重,

故未作分析。5 种培养基中,甘油 - 天门冬酰胺培养基(L)分离放线菌种类最多,R2A(R)和改良高氏(G)培养基次之。

综合分析南北坡分离的放线菌种类可知,甘油 - 天门冬酰胺培养基(L)分离放线菌种类最多,为 35 种;R2A(R)和改良高氏(G)培养基分离效果相当,低于甘油 - 天门冬酰胺培养基(L);海藻糖 - 脯氨酸培养基(D)分离放线菌种类数最少,仅为 4 种,但初步形态学鉴定结果显示其种类较为独特,可见其分离稀有放线菌确有优势。不同培养基分离放线菌种类差别可能主要与培养基养分构成、植被类型等相关。

2.3 不同林地类型放线菌的分离效果及分布规律

土壤是放线菌生长的天然场所,不同植被类型的土壤中蕴藏的放线菌资源存在一定差异。选取代表性最好的甘油 - 天门冬酰胺培养基对太白山南北坡海拔高度不同的 13 种典型林地土壤中放线菌的分布规律进行了分析,结果见表 3,表 4,图 1,图 2。

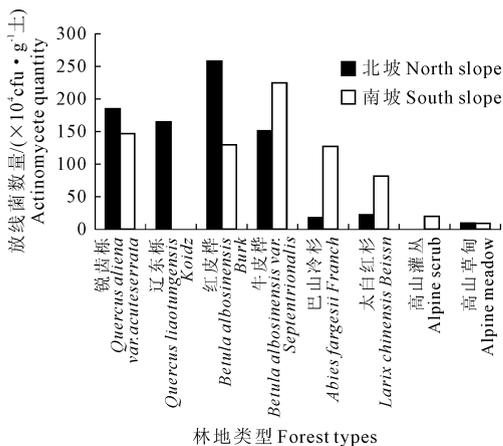


图 1 太白山不同植被土壤分离放线菌数量

Fig. 1 Actinomycete quantity of the soil samples on Taibai mountain

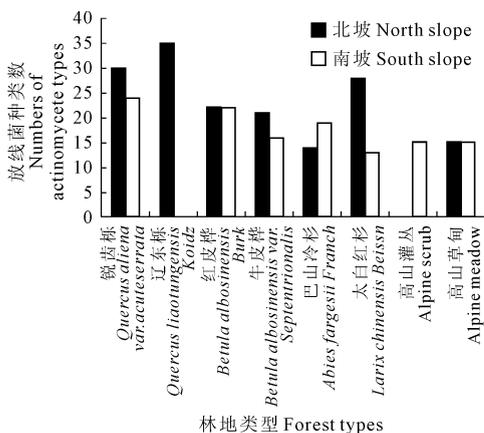


图 2 太白山不同植被土壤分离放线菌种类

Fig. 2 Numbers of actinomycete types of the soil samples on Taibai mountain

2.3.1 不同林地类型分离放线菌的数量及分布规律 分析北坡不同植被分离的放线菌数量可知,红皮桦分离的放线菌数量为 258.0×10^4 cfu · g⁻¹土,明显高于其它林地类型;牛皮桦、辽东栎和锐齿栎土壤分离放线菌数量差异较小,但均显著低于红皮桦;巴山冷杉、太白红杉和高山草甸土壤分离放线菌数量相较于前四种土壤类型,显著降低。

分析南坡不同植被分离的放线菌数量可知,牛皮桦分离的放线菌数量为 225.0×10^4 cfu · g⁻¹土,明显高于其它林地类型;锐齿栎较红皮桦低,但显著高于其它植被;巴山冷杉和红皮桦之间分离数量差别不大,均低于牛皮桦和锐齿栎;太白红杉、高山灌丛、高山草甸分离的放线菌数量依次呈现显著差异。

由图 1 可知,锐齿栎和红皮桦放线菌的分离数量北坡高于南坡,牛皮桦、巴山冷杉和太白红杉分离放线菌数量北坡低于南坡,可见随着海拔的升高,南坡土壤放线菌数量逐渐增加。南北坡不同植被分离放线菌的数量,均随着海拔升高,先升高后降低,这与土壤养分的变化趋势是一致的。这可能是由于海拔升高,光照充足,温度升高,有利于微生物的活动。

2.3.2 不同林地类型分离放线菌的种类及分布规律 分析北坡不同林地类型分离的放线菌种类可知,辽东栎和锐齿栎分离放线菌种类数高于或显著高于其它林地类型,分离的种类数分别为 35 种和 30 种;太白红杉较二者低,但显著高于其它林地类型;牛皮桦和红皮桦分离的放线菌种类数无差异;太白红杉中分离的放线菌种类最少,为 13 种。

分析南坡不同植被分离的放线菌种类可知,锐齿栎、红皮桦、牛皮桦和巴山冷杉分离的放线菌种类数无差异,其中锐齿栎分离放线菌数量最多,为 20 种;高山草甸土壤中分离的放线菌种类最少。

由图 2 可知,锐齿栎、牛皮桦和太白红杉的分离种类数北坡高于南坡,红皮桦分离的种类数南北坡大致相当,巴山冷杉的分离种类数北坡低于南坡。南北坡不同林地类型分离放线菌的种类数均表现出随着海拔升高先降低后升高又降低的趋势。

2.4 放线菌数量与土壤养分的相关性

土壤微生物数量与土壤理化性质密切相关^[10-11]。分析五种培养基分离的放线菌数量与土壤养分的相关性,结果见表 5,表 6。

由表 5,分析各养分之间关系可知,pH 和有机质、全氮、硝铵态氮和速效钾之间表现为正相关关系,与硝态氮的相关性达显著水平,与速效磷呈负相关关系。有机质与全氮和速效钾呈显著的正相关关系,同铵态氮呈极显著正相关关系,与硝态氮和速效磷呈负相关关系。铵态氮和速效磷呈显著负相关关

系,与速效钾呈显著正相关关系。硝态氮与速效磷、速效钾均呈正相关关系。速效磷与速效钾呈负相关关系。分析养分与各培养基之间关系可知,改良高氏(G)、甘油-天门冬酰胺(L)和改良高氏二号(E)培养基分离的放线菌数量与速效磷含量均呈显著正相关关系,而与 pH、有机质、全氮、铵态氮、速效钾均呈负相关关系。R2A 培养基与速效磷呈正相关关系。海藻糖-脯氨酸(D)培养基与全氮呈显著负相关关系。

由表 6 分析各养分之间关系可知,pH 和有机质、全氮、硝铵态氮、速效磷、速效钾之间表现为正相关关系,与铵态氮相关性极显著。有机质与全氮、硝铵态氮、速效钾均呈正相关关系,与速效磷呈负相关

关系。全氮与硝铵态氮、速效磷呈正相关关系,与铵态氮相关性显著,与速效钾呈负相关关系。硝铵态氮与速效钾呈正相关关系。速效磷与速效钾呈正相关关系。分析养分与各培养基之间关系可知,改良高氏(G)、甘油-天门冬酰胺(L)、R2A(R)和改良高氏二号(E)培养基分离的放线菌数量与全氮、铵态氮呈正相关关系,与 pH、速效磷、速效钾呈正相关性,而与有机质和硝态氮呈负相关关系。海藻糖-脯氨酸(D)与各养分之间均呈负相关关系。

综合分析可知,改良高氏(G)、甘油-天门冬酰胺(L)、R2A(R)和改良高氏二号(E)培养基分离放线菌数量与速效磷相关性较好,且南北坡均表现出正相关关系;与有机质相关性南北坡均表现出负相关关

表 5 北坡分离放线菌数量与土壤养分指标相关关系

Table 5 Relationship between actinomycete quantity and soil nutrients on the north slope

指标 Items	pH	有机质 Organic matter	全氮 Total nitrogen	铵态氮 NH ₄ ⁺ - N	硝态氮 NO ₃ ⁻ - N	速效磷 Available phosphorus	速效钾 Available potassium
有机质 Organic matter	0.566						
全氮 Total nitrogen	0.227	0.858 *					
铵态氮 NH ₄ ⁺ - N	0.617	0.892 * *	0.653				
硝态氮 NO ₃ ⁻ - N	0.762 *	-0.209	0.073	-0.450			
速效磷 Available phosphorus	-0.534	-0.425	-0.143	-0.769 *	0.568		
速效钾 Available potassium	0.653	0.768 *	0.453	0.786 *	0.252	-0.533	
G	-0.254	-0.346	-0.355	-0.575	0.210	0.803 *	-0.257
L	-0.320	-0.430	-0.414	-0.652	0.289	0.830 *	-0.284
R	-0.119	-0.285	-0.344	-0.501	0.093	0.738	-0.164
E	-0.251	-0.324	-0.330	-0.550	0.196	0.794 *	-0.240
D	0.190	-0.631	-0.821 *	-0.475	-0.230	0.014	-0.090

注: * 表示在 0.05 水平显著。

Note: * refer to significant difference at $P < 0.05$.

表 6 南坡分离放线菌数量与土壤养分指标相关关系

Table 6 Relationship between actinomycete quantity and soil nutrients on the south slope

指标 Items	pH	有机质 Organic matter	全氮 Total nitrogen	铵态氮 NH ₄ ⁺ - N	硝态氮 NO ₃ ⁻ - N	速效磷 Available phosphorus	速效钾 Available potassium
有机质 Organic matter	0.680						
全氮 Total nitrogen	0.459	0.227					
铵态氮 NH ₄ ⁺ - N	0.875 * *	0.532	0.769 *				
硝态氮 NO ₃ ⁻ - N	0.014	0.470	0.174	0.098			
速效磷 Available phosphorus	0.489	-0.148	0.379	0.449	-0.061		
速效钾 Available potassium	0.322	0.298	-0.074	0.192	0.512	0.434	
G	0.373	-0.026	0.685	0.626	-0.292	0.320	0.070
L	0.173	-0.127	0.685	0.482	-0.188	0.251	0.065
R	0.181	-0.048	0.677	0.506	-0.066	0.196	0.149
E	0.330	-0.229	0.709	0.516	-0.338	0.649	0.046
D	-0.118	-0.121	-0.329	-0.122	-0.249	-0.358	-0.581

注: * 表示在 0.05 水平显著。

Note: * refer to significant difference at $P < 0.05$ level.

系;与全氮、铵态氮相关性较好,与 pH、速效钾相关性一般,且相关关系均表现出北坡负相关,南坡正相关。海藻糖-脯氨酸(D)与各养分相关关系均不显著。

3 讨论与结论

吕世丽^[12]等研究表明秦岭牛背梁自然保护区不同海拔土壤养分状况存在差异,各养分含量的最大值多出现在海拔 1 900~2 000 m,各养分含量随海拔高度的变异规律存在差异。本研究发现,秦岭主峰太白山南北坡土壤养分大体呈现中海拔林地含量相对较高,低海拔林地与高海拔林地含量相对较低,即自低海拔至高海拔不同林地类型土壤养分整体呈现先升高后降低的趋势,这与土壤中分离的放线菌数量的规律相一致。

有研究表明,高氏一号非常适合放线菌尤其是链霉菌的生长,腐殖酸、酵母膏作为碳源能分离多个属的放线菌,海藻糖作为碳源有利于分离稀有放线菌^[13-16],在太白山不同海拔高度土壤中生存着大量拮抗性放线菌^[17]。本研究所用五种培养基中,分离放线菌效果最好的是甘油-天门冬酰胺培养基(L),该培养基在分离数量及种类上均占优,数量最高可达 258×10^4 cfu·g⁻¹土,分离种类最多为 35 种;改良高氏培养基(G)在南坡的分离效果整体优于北坡,更适用于分离南坡林地土壤的放线菌;R2A 培养基(R)更适合分离中高海拔林地放线菌;海藻糖-脯氨酸培养基(D)在分离放线菌数量及种类都较少,但其分离得到的放线菌形态奇特,具体需进行后续分子生物学鉴定分析。南北坡不同林地类型分离放线菌效果均表现出随着海拔升高先升高后降低的趋势。中海拔林地类型,如北坡的红皮桦、牛皮桦,南坡的牛皮桦,分离的放线菌数量均显著高于其它林地类型,最高海拔的高山草甸分离的放线菌数量最少。

放线菌数量及种类与土壤养分相关性不同。有研究表明土壤放线菌数量与有机质、全氮、全磷、速效氮、速效磷含量呈极显著或显著正相关关系^[18-20],也有研究表明放线菌含量与有机质、全氮呈负相关关系^[21]。本研究发现,分离放线菌数量与速效磷相关性较好,且南北坡均表现出较好的正相关关系;坡向对放线菌的分离效果与土壤养分的关系密切,放线菌分离效果与全氮、铵态氮相关性较好,pH、速效钾相关性一般,且相关关系均表现出北坡负相关,南坡正相关。其原因可能是光照,温度,降雨综合影响土壤养分含量,导致局部环境差异较

大,进而导致土壤养分与分离效果相关关系在南北坡呈现较大差异。

参 考 文 献:

- [1] Demian A L, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2009, 62(1): 5-16.
- [2] 傅志军, 张行勇, 刘顺义, 等. 秦岭植物区系和植被研究概述 [J]. *西北植物学报*, 1996, 16: 93-106.
- [3] 方 正, 高淑贞. 秦岭太白山南北坡的植被垂直带谱 [J]. *植物生态学与地植物学丛刊*, 1963, (1): 162-163.
- [4] 姜成林, 徐丽华. 微生物资源学(第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1997: 16-21.
- [5] 李文均, 唐蜀昆, 王 栋, 等. 新疆青海中度嗜盐放线菌生物多样性初步研究 [J]. *微生物学报*, 2004, 44(1): 1-7.
- [6] 顾孔珍, 钱 纯, 罗岳平. 用 R2A 培养基提高饮用水中细菌总数检出率 [J]. *净水技术*, 2004, 23(1): 42-44.
- [7] 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.
- [8] 鲍士旦. 土壤农化分析(第三版) [M]. 中国农业出版社, 1999.
- [9] 程丽娟, 薛泉宏, 来航线, 等. 微生物学实验技术 [M]. 北京: 世界图书出版公司, 1998.
- [10] Rao A V, Venkateswarlu B. Microbial ecology of the soils of Indian desert [J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 1983, 10(4): 361-369.
- [11] Venkateswarlu B, Rao A V. Distribution of microorganisms in stabilised and unstabilised sand dunes of the Indian desert [J]. *Journal of Arid Environments*, 1981, 4(3): 203-207.
- [12] 吕世丽, 李新平, 李文斌, 等. 牛背梁自然保护区不同海拔高度森林土壤养分特征分析 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2013, 41(4): 161-168.
- [13] 张学武, 张建丽. 稀有放线菌的选择性分离 [J]. *生命科学仪器*, 2005, 3(6): 17-20.
- [14] Bromfield E S P, Wheatcroft R, Barran L R. Medium for direct isolation of *Rhizobium meliloti* from soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26(4): 423-428.
- [15] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes [J]. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65(5): 501-509.
- [16] 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, 1(1): 181-183.
- [17] 朱文杰, 薛泉宏, 曹艳茹, 等. 秦岭太白山北坡土壤拮抗性放线菌分布及特性 [J]. *应用生态学报*, 2011, 22(11): 3003-3010.
- [18] 陈莉莉, 王得祥, 于 飞, 等. 松栎混交林土壤微生物数量与土壤酶活性及土壤养分关系的研究 [J]. *土壤通报*, 2014, (1): 77-84.
- [19] 肖 焯, 黄志刚, 武海涛, 等. 三江平原典型湿地类型土壤微生物特征与土壤养分的研究 [J]. *环境科学*, 2015, (5): 1842-1848.
- [20] 赵卉琳, 来航线, 冯昌增, 等. 新疆部分地区盐碱荒漠化土壤养分及放线菌区系组成 [J]. *西北农业学报*, 2008, 17(1): 161-166.
- [21] 何志祥, 朱 凡. 雪峰山不同海拔梯度土壤养分和微生物空间分布研究 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(31): 73-78.