

黄河中上游半干旱区典型盐渍土中拮抗性放线菌筛选

来航线,强郁荣,乔正良,杨雨林,李 丽

(西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:对采自陕西、宁夏和内蒙等地典型盐渍土中放线菌组成及拮抗性进行了研究。结果表明:(1) 该地区盐渍土中放线菌以链霉菌属为主,非链霉菌仅占 9.27%,链霉菌属中以球孢类群,粉红孢类群,灰褐类群,黄色类群为主,占到放线菌总数的 55.62%。(2) 供试的 706 株放线菌中有拮抗活性的占到 76.44%,但广谱性拮抗菌株较少;对细菌拮抗能力较真菌强;拮抗性放线菌以粉红孢类群、灰褐类群和球孢类群为优势类群;(3) 发酵滤液拮抗性试验筛选出 4 株能产生较强抑菌活性物质的菌株,其中 3 株都是粉红孢类群。

关键词:黄河中上游半干旱区;盐渍土;放线菌;拮抗性

中图分类号: S432.4⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2006)05-0188-05

据统计,全国约有 3 693 万 hm² 现代(活化)盐渍土,而西北地区就占 60%左右,其中与灌溉有关的土壤盐渍化面积达 200 万 hm²[1],有近 70%位于西北地区。黄河中上游半干旱盐渍土区包括青海、甘肃东部、宁夏、内蒙古河套地区和陕西两个分布区,其盐渍土以独特的理化性质和形成条件成为极端微生物分布的一个重要区域。目前对于盐碱环境中的微生物资源利用研究也获得了一些成果,但较多是对于其产生的特殊的酶进行的研究[2~5],对于拮抗性微生物的报道极少。本试验主要探寻陕西、宁夏和内蒙等黄河中上游半干旱区盐渍土区中的拮抗性放线菌状况,以期为该地区的拮抗性微生物资源开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌种 本课题组于 2002~2005 年分离自陕西、宁夏和内蒙典型盐碱土中的放线菌共 706 株。

1.1.2 培养基

保存培养基:1% NaCl 的高氏 1 号合成培养基[6]。

拮抗试验用培养基:PDA^[6]、牛肉膏蛋白胨琼脂^[6]、改良黄豆粉琼脂^[7]。

1.1.3 供试靶标菌 鼠伤寒沙门氏菌(*Samonella typhimurium*)(G⁻),大肠杆菌(*Escherichia coli*)(G⁻),肠型点状气单胞菌(*A. Hydrophila*)(G⁻),

金黄色葡萄球菌(*Staphalococcus aureus*)(G⁺),无乳链球菌(*group B streptococci*, GBS)(G⁺),棉花黄萎病菌(*Verticilliumdahlia Kleb*),黄瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporium f. sp cucumarinum owen*, H),小麦全蚀病菌(*Gaeumannomycesgraminisvar. tritici*),辣椒疫霉(*Phytophthora Capsici*)。

上述靶标菌中,辣椒疫霉、黄瓜枯萎病菌由西北农林科技大学微生物资源研究室提供;鼠伤寒沙门氏菌、肠型点状气单胞菌由动物科学学院王高学老师提供;大肠杆菌、金黄色葡萄球菌由动物科学学院张耀相老师提供;棉花黄萎、小麦全蚀病菌由植保学院杨之为老师提供。

1.2 方 法

1.2.1 放线菌活化及初步鉴定 将供试放线菌转接于 1%NaCl 的高氏 1 号斜面培养基上,28℃培养 7 d。对供试放线菌依据其形态和培养特征,参照《链霉菌鉴定手册》^[8],将供试放线菌划为链霉菌与非链霉菌,链霉菌鉴定到类群。

1.2.2 拮抗性放线菌筛选

(1) 琼脂块制备

将供试放线菌菌株接种在黄豆粉培养基平板上,并涂布均匀,28℃恒温培养 12 d。用打孔器在皿内菌苔生长均匀的地方打孔,制备琼脂块,备用。

(2) 靶标菌平板制备

将大肠杆菌,鼠伤寒沙门氏菌,肠型点状气单胞菌,金黄色葡萄球菌转接斜面 28℃培养 24~36 h,

收稿日期:2006-05-20
基金项目:西北农林科技大学博士点基金
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。

加入无菌水制备菌悬液,接种于牛肉膏蛋白胨培养基上,并用无菌刮铲涂匀,备用。将棉花黄萎病菌,黄瓜枯萎病菌,辣椒疫霉病菌,小麦全蚀病菌 28℃ 培养 3~4 d,按同样方法接种于 PDA 平板上备用。

(3) 抑菌试验

将制备好的琼脂块用无菌竹签挑出,放置于制备好的靶标菌平板上。细菌和真菌分别放置于 28℃ 恒温培养箱培养 1 d 和 3 d(小麦全蚀病菌生长较慢需培养 7 d),进行结果观察。

(4) 结果记录

观察并测量抑菌圈直径大小及透明度情况,进行记录。

1.2.3 发酵滤液拮抗性试验 发酵滤液拮抗性试验采用杯碟法。

(1) 发酵液制备

放线菌接入液体培养基,在恒温摇床中培养 6 d (28℃),发酵液用超速冷冻离心机 8 000 r/min,5℃ 下离心 15 min,取上清液用细菌滤器(孔径 0.22 μm)过滤,得无菌滤液备用。

(2) 靶标菌平板制备同前。

(3) 抑菌试验

将灭菌的牛津杯放入已制备好的靶标菌平板内,每杯中加入无菌发酵滤液 150 μl,皿内重复 3 次。28℃ 培养 1 d,结果记录方法同上。

2 结果与分析

2.1 供试放线菌类群组成

706 株供试放线菌通过形态和培养特征分析,初步划分为链霉菌与非链霉菌两类,并将链霉菌鉴

定到类群,结果见表 1。

表 1 供试放线菌的分类组成
Table 1 Types of actinomycetes strains tested

种属 Genus	比例 Percentage(%)	
球孢类群 <i>Globosporus</i>	16.41	
粉红孢类群 <i>Roseosporus</i>	13.83	
灰褐类群 <i>Griseofuscus</i>	13.53	
黄色类群 <i>Flavus</i>	11.85	
金色类群 <i>Aureus</i>	9.57	
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	灰红紫类群 <i>Griseorubroviolaceus</i>	7.29
	白孢类群 <i>Albosporus</i>	6.69
	烬灰类群 <i>Cinereus</i>	5.62
	淡紫灰类群 <i>Lavendulae</i>	3.04
	青色类群 <i>Glaucus</i>	1.67
	蓝色类群 <i>Cyaneus</i>	0.91
	绿色类群 <i>Viridis</i>	0.30
非链霉菌属 Non- <i>Streptomyces</i> genus	9.27	

由表 1 可看出,供试放线菌以链霉菌属为主,共有 12 个类群,以球孢类群,粉红孢类群,灰褐类群,黄色类群为主,占到放线菌总数的 55.62%,是主要类群;其次为灰红紫类群、白孢类群、金色类群和烬灰类群合计占到了 29.17%,非链霉菌很少,只占到放线菌总数的 9.27%。

2.2 供试放线菌的拮抗性试验

供试放线菌对 9 种靶标菌的拮抗比例,类群组成及对不同靶标菌的拮抗性强弱结果见表 2、表 3 和表 4。

表 2 拮抗性放线菌比例
Table2 The proportion of antagonistic actinomycetes

靶标菌种类数 Number of target microbe	0	1	2	3	4	5	6	7
拮抗比例 Proportion (%)	23.56	27.36	21.12	12.31	8.51	5.02	1.22	0.91

从表 2 可以看出,参试的 706 株放线菌中有拮抗活性的占到 76.44%,其中对 1 种靶标菌有拮抗作用的放线菌最多占到 27.36%,同时对 7 种靶标菌都有拮抗作用的放线菌只有 0.91%。随靶标菌种类数增加,拮抗性放线菌株数减少,广谱性拮抗放线菌较少。

表 3 可以看出,链霉菌中粉红孢类群、灰褐类群和球孢类群对 9 种靶标菌有拮抗作用的菌株比例都

分别在 10%以上,灰红紫类群和金色类群对各靶标菌有拮抗的菌株数次之。非链霉菌属除对无乳链球菌及小麦全蚀无抑菌作用外,对其他病原菌都有不同比例的抑菌作用。其中对金黄色葡萄球菌和肠型点状气单胞菌及鼠伤寒沙门氏菌有抑制作用的菌株较多。从表中可看出供试菌株对细菌有抑制作用的菌株比例略高于真菌。

表 3 拮抗性放线菌类群组成(%)

Table 3 Sort compose of antagonistic actinomycetes

种属 Genus		靶标菌 Target microorganism								
		J	C	E	S	W	M	H	P	X
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	白孢类群 <i>Albosporus</i>	1.97	4.76	4.85	5.70	6.30	4.97	7.19	3.27	7.41
	黄色类群 <i>Flavus</i>	8.55	8.93	7.77	12.44	9.45	11.18	15.69	9.35	7.41
	淡紫灰类群 <i>Lavendulae</i>	3.95	2.38	3.88	2.59	3.15	3.11	2.61	2.80	3.70
	粉红孢类群 <i>Roseosporus</i>	15.79	15.48	16.50	13.99	16.54	18.63	17.65	13.08	18.52
	灰褐类群 <i>Griseofuscus</i>	13.82	12.50	11.65	10.88	17.32	11.80	13.73	16.82	18.52
	金色类群 <i>Aureus</i>	11.84	8.93	8.74	10.88	13.39	11.18	9.80	10.28	11.11
	烬灰类群 <i>Cinereus</i>	5.92	4.17	7.77	7.77	8.66	6.83	6.54	5.14	3.70
	蓝色类群 <i>Cyaneus</i>	1.97	1.79	0.97	1.04	0.79	2.48	0.65	2.34	0.00
	绿色类群 <i>Viridis</i>	0.66	0.60	0.97	0.52	0.00	0.00	0.00	0.47	0.00
	青色类群 <i>Glaucus</i>	2.63	1.19	3.88	1.04	1.57	3.11	1.96	0.93	0.00
	球孢类群 <i>Globosporus</i>	13.16	19.64	17.48	16.58	20.47	16.77	11.76	19.63	11.11
	灰红紫类群 <i>Griseorubroviolaceus</i>	10.53	10.12	10.68	7.77	2.36	4.35	6.54	9.35	18.52
非链霉菌属 Other genus		9.87	9.52	4.85	8.81	0.00	5.59	5.88	6.54	0.00

注：J,C,E,S,W,M,H,P,X 分别代表金黄色葡萄球菌, 肠型点状气单胞菌, 大肠杆菌, 鼠伤寒沙门氏菌, 无乳链球菌, 棉花黄萎病, 黄瓜枯萎病, 辣椒疫霉病和小麦全蚀病。

Note：J,C,E,S,W,M,H,P,X represent *Staphalococcus aureus*, *Hydrophila*, *Escherichia coli*, *Samonella typhimurium*, *Group B streptococci*, *Verticilliumdahlia Kleb*, *Fusarium oxysporium f. sp cucumarinum owen*, *hytophthora Capsici*, *Gaeumannomycesgraminisvar* respectively.

表 4 不同靶标菌的拮抗性放线菌比例及拮抗能力

Table 4 Antagonistic activity and percent of antagonistic actinomycetes(%)

靶标菌 Target microorganism	$R \leq 10$	$10 < R \leq 20$	$R > 20$	Total
金黄色葡萄球菌 <i>Staphalococcus aureus</i> (J)	10.2	11.3	0.7	22.2
肠型点状气单胞菌 A· <i>Hydrophila</i> (C)	13.6	9.6	0.6	23.8
大 肠 杆 菌 <i>Escherichia coli</i> (E)	6.2	7.8	0.8	14.8
鼠伤寒沙门氏菌 <i>Samonella typhimurium</i> (S)	10.8	15.2	2.1	28.1
无乳链球菌 group B streptococci(W)	9.6	21.3	2.9	32.8
棉花黄萎病菌 <i>Verticilliumdahlia Kleb</i> (M)	11.3	10.1	1.6	23.0
黄瓜枯萎 <i>Fusarium oxysporium f. sp cucumarinum owen</i> (H)	8.9	13.1	0.1	22.1
辣椒疫霉 <i>Phytophthora Capsici</i> (P)	19.8	10.8	0.3	30.9
小麦全蚀病菌 <i>Gaeumannomycesgraminisvar</i> (X)	9.8	4.3	0.5	16.3

注：R 代表抑菌圈直径(mm)。Note：R represents the diameter of restraining circle(mm)。

从表 4 可知, 供试放线菌对 9 种靶标菌有抑菌作用的占 14.8%~32.8%;对无乳链球菌和鼠伤寒沙门氏菌有拮抗作用的菌株较多, 分别达到 32.8%和 28.1%, 且抑菌作用较强的菌株 ($R > 20$ mm) 的菌株所占比例较高, 分别达到 2.9%和 2.1%;对金黄色葡萄球菌和肠型点状气单胞菌及辣椒疫霉有拮抗作用的菌株也较多, 分别为 22.2%、23.8%和 30.9%, 但拮抗能力较弱的菌株占比例较大。

2.3 发酵滤液拮抗性试验

通过供试菌株拮抗性试验, 筛选出部分优良拮

抗性放线菌株, 对这些菌株进行液体发酵, 用发酵滤液进行拮抗性试验, 用以初步判定拮抗作用是菌体之间生长竞争抑制还是菌株产生的抑菌活性抑制物质作用。

由于细菌培养周期较短, 故进行发酵滤液拮抗试验时选择细菌作为指示菌, 鼠伤寒沙门氏菌为动物肠道致病菌, 肠型点状气单胞菌为水产动物肠道致病菌, 因此选择这两种病原菌作为代表进行发酵液拮抗性试验。试验结果见表 5。

表 5 发酵液拮抗性试验(抑菌圈直径 mm)

Table 5 Antagonistic test using the fermentation solution of actinomycetes (the diameter of restraining circle, mm)

编号 No.	类群 Sort	靶标菌 Target microorganism	
		鼠伤寒沙门氏菌 <i>Samonella typhimurium</i>	肠型点状气单胞菌 <i>A. Hydrophila</i>
16A09	淡紫灰类群 <i>Lavendulae</i>	13	—
56H02	金色类群 <i>Aureus</i>	15	22
02J10	淡紫灰类群 <i>Lavendulae</i>	—	—
14A21	灰红紫类群 <i>Griseorubroviolaceus</i>	15	—
02H26	灰红紫类群 <i>Griseorubroviolaceus</i>	—	—
43A05	白孢类群 <i>Albosporus</i>	13	—
43D06	非链霉菌 other Genus	25	—
14J18	球孢类群 <i>Globosporus</i>	20	—
49A01	粉红孢类群 <i>Roseosporus</i>	13	—
42A05	灰红紫类群 <i>Griseorubroviolaceus</i>	13	—
11A01	金色类群 <i>Aureus</i>	16	—
17A05	球孢类群 <i>Globosporus</i>	14	—
32A02	白孢类群 <i>Albosporus</i>	12	—
43A04	粉红孢类群 <i>Roseosporus</i>	21	25
31A08	球孢类群 <i>Globosporus</i>	20	—
13H06	粉红孢类群 <i>Roseosporus</i>	39	20
48A02	球孢类群 <i>Globosporus</i>	12	—
02A07	灰红紫类群 <i>Griseorubroviolaceus</i>	12	—
02D01	粉红孢类群 <i>Roseosporus</i>	14	20
43J01	烬灰类群 <i>Cinereus</i>	13	—
35A03	金色类群 <i>Aureus</i>	11	—
02A01	灰红紫类群 <i>Griseorubroviolaceus</i>	—	11
14D10	金色类群 <i>Aureus</i>	11	—

由表 5 可以看出, 56H02, 43A04, 13H06, 02D014株菌的发酵滤液对两种不同的病原菌均有较好的抑制作用, 除 56H02 为金色类群外, 其余 3 株都是粉红孢类群。对其抑菌物质的性质及其抑菌机制正在进一步的研究中。

3 结 论

- 1) 黄河中上游半干旱区盐渍土中放线菌以链霉菌属为主, 非链霉菌占 9.27%, 链霉菌属中以球孢类群、粉红孢类群、灰褐类群、黄色类群为主, 占到放线菌总数的 55.62%。
- 2) 参试的 706 株放线菌中有拮抗活性的占到 76.44%, 广谱性拮抗菌较少; 对细菌拮抗能力较真菌强; 拮抗性放线菌以粉红孢类群、灰褐类群和球孢

类群为优势类群。

3) 发酵滤液拮抗性试验筛选出 4 株能产生较强抑菌活性物质的菌株, 其中 3 株都是粉红孢类群。筛选出的几株优良拮抗菌株经过生物试验, 显示了良好的生物治疗效果, 其结果另文报道。对其产生的抑菌物质及其抑菌机理正在进一步研究。

黄河中上游半干旱区特殊的生态环境及盐渍土特殊的理化性质孕育了大量具有特殊代谢途径、代谢产物的微生物, 为研究和开发具有特殊功能的新产品、新工艺提供了宝贵的菌种资源, 开发利用这些微生物资源对于盐渍土壤的生物改良也有重要意义。

参 考 文 献:

[1] 王遵亲. 中国盐渍土[M]. 北京: 科学出版社, 1993.

[2] 田新玉, 周培瑾, 王大珍. 嗜盐碱性淀粉酶产生条件和性质的

初步研究[J].微生物学通报,1994,34(5):355—359.

[3] 黄红英,方海红,刘爱民,等.一株地衣芽胞杆菌碱性蛋白酶的
研究 I [J].微生物学通报,2001,28(5):20—24.

[4] Nyysä Oä, A, Kerovu. J, Kaukinen, P. et al. Extreme halophiles
synthesize betaine from glycine by methylation[J]. J Bio Chem,
2000, 275(29):22196—22201.

[5] Maltseva O, Oriol P. Monitoring of an alkaline 2, 4, 6—2
trichlorophenol-degrading enrichment culture by DNA finger-
printing methods and isolation of the responsible organism, haloal-

kaliphilic nocardioiodes sp. Strain M⁶[J]. Appl Environ Microbio,
1997, 63:4145—4149.

[6] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版
公司,2000.

[7] 颜霞,朱铭莪,薛泉宏,等. 西藏亚高山草原土壤放线菌研究
[J].西北农业学报,1999,8(2):97—101.

[8] 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.

Screening of antagonistic actinomycetes from typical saline soils in
semiarid area of the upper and middle reaches of Yellow River

LAI Hang-xian, QIANG Yu-rong, QIAO Zheng-liang, YANG Yu-lin, LI Li

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

Abstract: In this paper the composition of actinomycetes sorts and their antagonism was investigated, which were separated from the saline soils of the upper and middle reaches of Yellow River. The results show that the main sort of actinomycetes in this area is *Streptomyces*, and the other genus only occupies by 9.27%. *Globosporu*, *Roseosporus*, *Griseofuscus* and *Flavus* are the major genus among *Streptomyces*. The strains of actinomycetes which have antagonistic activity occupy 76.44% of the 706 strains tested, but few are broad-spectrum strains; these strains have stronger antagonistic capability to bacteria than to fungi; the dominant genus of antagonistic actinomycetes are *Roseosporus*, *Griseofuscus* and *Globosporu*. Through the antagonistic test of ferment filtrate, 4 strains that can produce some substance with higher antagonistic activity have been screened; three of them belong to *Roseosporus*.

Keywords: semiarid area in upper and middle reaches of Yellow River; saline soil; actinomycetes; antagonism

(上接第 160 页)

Analysis on ecological adaptability of cotton in agricultural regions of oasis

JIANG Gui-ying, BAI Li, LAI Xian-qi, MA Lan-hua, LU Xin

(Key Laboratory of Oasis Ecological Agriculture of Xinjiang Corps, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: The paper analyses the coupling effect of ligh and heat resource, and the ecological adaptability of cotton in the agricultural regions of oasis. It shows that the cotton in the agricultural regions of oasis is superior in quality, which is because that the special cultivating technique is coincident with the abundant energy of light-heat resource during boll development period, and harmonizes the relationship between plants and envoirment, therefore, the cotton industries of oasis canbe developed sustainedly.

Keywords: cotton; agricultural region of oasis; ecological adaptability

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net