

青海渔水河嗜盐耐盐放线菌的初步研究

朱 华¹, 来航线², 傅艳萍¹, 薛泉宏², 孙 婷²

(1. 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 对青海渔水河河水、底泥及河旁沙土进行盐分离子及 pH 值的测定, 并通过不同培养基、盐种类和添加量的设计对渔水河中嗜盐耐盐放线菌资源进行了初步研究。结果表明: 渔水河样品均偏碱性; 河水的水溶性总盐及盐分离子含量均远远低于沙土, 其中泥土的水溶性总盐含量最高, 为 158.67 g/kg; 盐分阴离子中 Cl^- 含量最高, 阳离子中 K^+ 和 Na^+ 含量最高, 所以推断样品盐分离子主要以 NaCl 和 KCl 的形式存在; 分离共获得 89 株放线菌, 其中底泥中分离到的放线菌最多, 且改良淀粉酪素培养基的分离效果最好; 通过嗜盐耐盐放线菌的筛选, 得到 8 株嗜盐放线菌, 其中极端嗜 NaCl 菌 3 株, 极端嗜 KCl 菌 7 株, 还有 1 株嗜 K 型放线菌。

关键词: 渔水河; 盐分离子; 放线菌; 嗜盐放线菌; 筛选

中图分类号: Q938.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2009)01-0233-04

目前, 放线菌研究的一个重要趋势就是研究极端环境的放线菌。虽然人们很早就认识到微生物可以在高浓度盐环境, 如盐湖、晒盐场、海水以及盐渍土中生长, 但嗜盐放线菌的研究报道始于 1975 年^[1], 同嗜盐细菌相比, 历史要短得多, 且到目前为止发表的有效嗜盐放线菌只分布于 5 科 7 属^[2], 有 12 个生效描述种, 最高的嗜 NaCl 浓度仅为 23.52%^[3]。因此, 不断从环境中分离到新物种成为嗜盐放线菌研究的工作重点^[4]。

在我国青海有大面积的盐湖分布, 其盐含量多高达 15%~20%, 盐碱地地表含盐量达 50% 以上^[2], 蕴含有丰富的嗜盐、耐盐菌资源。但到目前为止对青海盐湖中的放线菌资源还罕有报道。柴达木盆地年平均气温在 2℃ 左右, 月平均气温年较差近 30℃, 极端最低气温在 -30℃ 左右, 极端最高气温可达 30℃ 以上, 全年各月气温的平均日较差大都超过 15℃; 年降雨量除东南一隅可达 150~200 mm 外, 绝大部分地区均在 50 mm 左右, 西部更是不足 20 mm, 成为我国最为著名的干燥区。该区气候寒冷干旱, 多风少雨, 日照时间长, 太阳辐射强, 且光照好; 平均风速大, 大风日数多, 表现出典型的大陆性荒漠气候特征和高原气候特征^[5,6]。位于青海柴达木盆地格尔木市东北约 40 km 的渔水河盐分含量高、类型丰富。本研究以渔水河这一高盐环境作为研究背景, 对该盐湖中的嗜盐及耐盐放线菌资源进行了初步研究。

1 材料及方法

1.1 试验样品

2007 年 7 月 28 日采自渔水河的河水、底泥及

河旁的沙土作为研究的对象。样品采集后立即装在封口无菌的塑料袋中。样品带回实验室后立即进行放线菌的分离, 分离后剩余的土样 4℃ 保存。

1.1.1 培养基 采用的分离培养基有腐殖酸培养基(HV)^[7]、土壤浸汁培养基^[8]和改良淀粉酪素培养基^[9]。

1.1.2 复合盐 主要设有 0%、7%、14% 和 21% 盐梯度, 都以 NaCl 和 KCl 为主, 各占 45%, 并添加少量 MgSO_4 (占 10%)。

1.2 方法

1.2.1 样品盐分离子及 pH 值的测定 将底泥和沙土在自然条件下风干用于土壤放线菌的分离(实际操作是在 105℃ 烘 3 天), 风干, 过 1 mm 筛, 用于盐分离子和 pH 值的测定。而水样直接用于盐分离子和 pH 值的测定。

土壤水溶性总盐量的测定——残渣烘干质量法; 钙和镁的测定——EDTA 滴定法^[10]; 钾和钠的测定——火焰光度法^[10]; 碳酸根和重碳酸根的测定——双指示剂—中和滴定法^[10]; 氯离子的测定——硝酸银滴定法^[10]; 硫酸根的测定——EDTA 间接络合滴定法^[10]; pH 值的测定——电位测定法。

1.2.2 放线菌的分离和纯化 采用平板稀释涂布分离法, 培养基中添加不同比例的复合盐, 盐溶液和培养基分别灭菌, 倒平板之前混合, 培养基的 pH 值均调为 7.5~8.0。置于 28℃ 下培养 3~4 周。

1.2.3 嗜盐及耐盐放线菌的筛选 按照目前国际上通用的嗜盐菌的划分标准, 进行盐梯度的设计, 即 0%、1.17%、2.93%、14.63%、30.4% 五个盐梯度。

收稿日期: 2008-08-22

作者简介: 朱 华(1983—), 女, 陕西榆林人, 在读硕士, 主要从事微生物资源与利用研究。

通讯作者: 来航线(1964—), 男, 陕西礼泉人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事微生物资源利用和微生物生态研究。E-mail: laihangxian@

采用液体培养法对供试菌株进行嗜盐、耐盐放线菌筛选,并确定其耐盐范围。

不同菌株对 NaCl、KCl 的耐受程度存在明显的差异,NaCl、KCl 也不同程度地影响放线菌的生长,但多数菌株生长所需的 Na^+ 可以被一定浓度的 K^+ 和 Mg^{2+} 所替代^[9],所以根据嗜盐放线菌对阳离子的专嗜性及邹静等^[11]提出的推测,本次实验对分离纯化得到的部分菌株进行嗜 Na 型放线菌和嗜 K 型放线菌的筛选。

2 结果与分析

2.1 样品盐分离子构成

测定样品中水溶性总盐、pH 值及盐分离子含量

表 2 渔水河中的盐分离子含量

Table 2 Contents of salt ions in Yushuihe

样品 Samples	离子组成 Ion composition(g/L 或 g/kg)							
	CO_3^{2-}	HCO_3^-	Cl^-	SO_4^{2-}	Ca^{2+}	Mg^{2+}	K^+	Na^+
河水 River water	0	1.403	5.954	1.128	0.0533	0.214	0.257	0.337
沙土 Sand soil	0.12	2.23	117.18	31.15	4.65	15.71	68.25	56.78

注:沙土为底泥与河旁的沙土按 1:1 混合的混合样。

Note: Sand soil is the mixture of sediment and sandy soil by 1:1.

由表 2 可以看出,阳离子中 Na^+ 和 K^+ 含量高于其他阳离子,在河水中含量分别为 0.337 g/L 和 0.257 g/L,在沙土中含量分别为 68.25 g/kg 和 56.78 g/kg; Mg^{2+} 含量次之,在河水和沙土中含量分别为 0.214 g/L 和 15.71 g/kg; 而阴离子中 Cl^- 含量最高,河水和沙土中分别为 5.954 g/L 和 117.18 g/kg; 其次为 SO_4^{2-} 。由此可以断定样品中是以 NaCl 和 KCl 为主要的化合物存在形式,且沙土中的含量远远高于河水,这就为设计分离复合盐和盐梯度提供了有利依据。同时也证明了我们之前所设计的分离复合盐及盐梯度的合理性。

2.2 放线菌的分离

2.2.1 不同培养基对放线菌分离效果的影响 三种不同培养基对不同的样品的放线菌分出率明显不同,统计不同样品在不同培养基里所分离出的放线菌数量,结果见图 1。

从图 1 可以看出,改良淀粉酪素培养基分离到的放线菌数量最多,且获得的种类也最多,为 59 种; HV 培养基上所获得的放线菌数量也很多,但是种类单一,只分离到 11 种;土壤浸汁培养基分离到的放线菌数量最少,获得 19 种放线菌。由此可以看出选用的三种培养基中改良淀粉酪素培养基的分离效果是最好的,分离到的放线菌数量和种类数均最多。

时,河水直接用于测定,而底泥和沙土烘干后再进行测定,其结果见表 1 和表 2。

表 1 实验样品水溶性总盐含量及 pH 值

Table 1 Total content of water-soluble salt and pH of test samples

样品 Samples	水溶性总盐(g/L 或 g/kg) Total content of water-soluble salt	pH
河水 River water	3.10	7.53
底泥 Sediment	158.67	7.90
沙土 Sandy soil	90.43	7.84

由表 1 可以看出,样品 pH 值均偏碱性,水溶性总盐含量都很高,其中底泥最高,达 158.67 g/kg,沙土次之,含量也高达 90.43 g/kg。由此可以看出本研究所选材料的特殊性和极端性。

□ HV培养基 HV Medium
■ 改良淀粉酪素培养基 Modified starch-casein medium
▨ 土壤浸汁培养基 Soil extraction medium

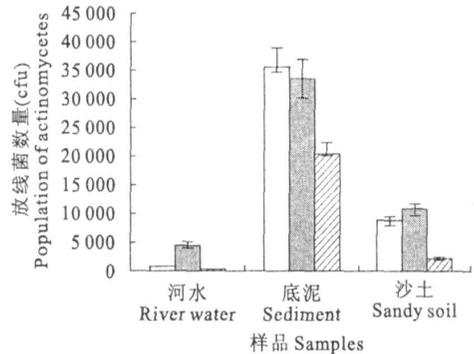


图 1 不同培养基分离到的放线菌数量

Fig. 1 Amount of Actinomycetes isolated with different mediums

从图 1 还可以看出,从底泥中分离到的总放线菌数量最多,为 89 600 cfu,远远高于样品沙土(22 000 cfu)和河水(5 880 cfu)。

2.2.2 复合盐的不同盐浓度对放线菌分离效果的影响 平板稀释涂布分离放线菌时主要设计有 0%、7%、14% 和 21% 四个盐梯度,不同盐浓度对不同的样品分离到的放线菌数量明显不同,结果如图 2。

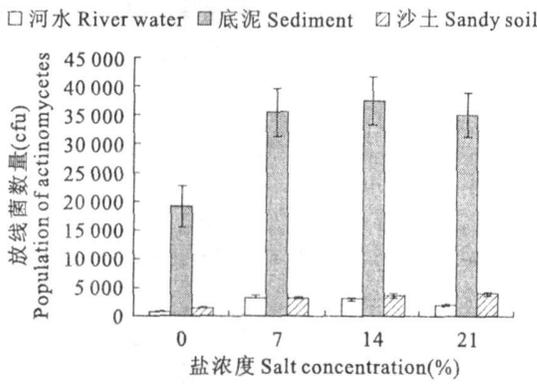


图 2 复合盐不同盐浓度对不同样品分离到的放线菌数量
Fig. 2 Actinomycetes amount of different salt concentration to different samples

从图 2 可以看出,河水、底泥和沙土在复合盐浓

表 3 嗜盐及耐盐放线菌的筛选结果

Table 3 Screening results of halophilic and salt tolerance Actinomycetes

项目 Items	盐梯度 Salt gradient (%)					
	0	1.17	2.93	14.63	30.4	
NaCl	生长株数 Strains	48	53	52	18	0
	比例 Percentage (%)	85.71	94.64	92.86	32.14	0
	最适生长株数 Optimum growth strains	9	12	23	11	0
	比例 Percentage (%)	16.07	21.43	41.07	19.64	0
KCl	生长株数 Strains	48	48	40	21	14
	比例 Percentage (%)	85.71	85.71	71.43	37.50	25.00
	最适生长株数 Optimum growth strains	16	7	16	9	8
	比例 Percentage (%)	28.57	12.50	28.57	16.07	14.29

从表 3 可以看出,所筛选的 56 株供试放线菌对 NaCl 和 KCl 的耐受性明显不同,尤其是最高耐盐程度差异较大。对于 NaCl 的耐受性,最高只达 14.63%,且只有 18 株菌可以在 14.63% 的盐浓度上生长,其中 11 株的最适生长浓度为 14.63%,占供试菌株的 19.64%。而对于 KCl 的耐受性,供试菌株中有 14 株可以在含盐量为 30.4% 的培养液中生长,其中 8 株的最适生长浓度为 30.4%,占供试菌株的 14.29%;有 21 株可以在 14.63% 的盐浓度上生长,其中 9 株的最适生长盐浓度为 14.63%,占供试菌株的 16.07%。

通过以上筛选还获得 8 株嗜盐放线菌,根据现在国际上通用的划分标准,将筛选到的 8 株嗜盐放线菌进行嗜盐程度的划分,结果见表 4。

由表 4 可以看出,供试的 8 株嗜盐放线菌对不同的盐类型的嗜盐程度明显不同。按照目前国际上通用的以 NaCl 来划分,有 1 株弱嗜盐放线菌,3 株中等嗜盐放线菌和 3 株极端嗜盐放线菌,但如果以

度为 7%、14% 和 21% 的培养基上分离到的总的放线菌数量分别为 9 060 cfu、127 600 cfu 和 12 400 cfu;从不添加复合盐的培养基上分离到的总放线菌数量为 21 700 cfu,远低于 7% (42 040 cfu)、14% (44 140 cfu) 和 21% (41 180 cfu) 培养基上分离到的,说明从样品中分离得到的放线菌大都是嗜盐或耐盐放线菌,且其中很大一部分菌株可以耐受浓度高达 21% 的盐。

2.3 嗜盐及耐盐放线菌的筛选

将分离获得的 89 株放线菌纯化,并埋片进行形态观察,挑选其中纯度高、形态特殊或分出盐浓度较高的 56 株进行嗜盐及耐盐放线菌的筛选,筛选结果见表 3。

KCl 来划分,有 1 株弱嗜盐放线菌和 7 株极端嗜盐放线菌;另外,获得 1 株极端嗜 K 型放线菌。

表 4 供试放线菌嗜盐程度的划分

Table 4 Classification of halophilic Actinomycetes

项目 Items	弱嗜盐菌 Weak-halophilic	中等嗜盐菌 Medium-halophilic	极端嗜盐菌 Extreme-halophilic	
NaCl	株数(个) Strains	1	3	3
	比例(%) Percentage	12.5	37.5	37.5
KCl	株数(个) Strains	1	0	7
	比例(%) Percentage	12.5	0	87.5

3 讨论

青海盐湖环境极端,含盐量高,存在大量的放线菌资源,尤其是嗜盐放线菌资源丰富。由于渔水河

盐环境的特殊性和嗜盐放线菌营养生理的特殊需求都与普通环境有较大差异,加上现有研究方法的限制,我们所分离到只是存在于其中的一小部分。因此在今后的嗜盐放线菌的分离研究中,不仅要考虑微生物生活的大环境,而且还应充分考虑微环境,综合特殊的分离条件(一定的盐浓度、一定比例的复合盐、一定的培养温度),特殊的营养需求等多种因素来不断完善和更新分离程序。

从对实验样品的盐分离子的测定结果中可以看出该地区的样品 K^+ 含量要比 Na^+ 高,且结合嗜盐放线菌筛选的结果,得出 K^+ 的含量对该地区放线菌的生长至关重要,且盐浓度越高 K^+ 的作用越突出。依据本研究结果,我们认为在以往嗜盐微生物的研究中存在一定缺陷:(1) 只关注高浓度的 $NaCl$ 而忽略了 K^+ 、 Mg^{2+} 等其他离子;(2) 以 $NaCl$ 作为划分嗜盐菌嗜盐程度具有一定的局限性。

目前研究报道的嗜盐、耐盐放线菌较少,且其嗜盐程度以低等、中等为主。而本实验获得了大量的嗜盐及耐盐放线菌,其中嗜盐放线菌以中等及极端嗜盐为主,且最高嗜盐浓度达到了 30.4%,极大地丰富了嗜盐放线菌的研究资源。本次实验还发现 1 株嗜 K 型的极端嗜盐放线菌,这一结果不仅揭示了嗜盐放线菌一些新的生理学特性,也为设计分离和培养提供了新的实验依据和指导。

除了嗜盐放线菌之外,实验中还发现有大量的耐盐程度较高的耐盐放线菌,这就需要对其进行耐盐性划分。对于所分离到的放线菌的耐盐性划分及

耐盐嗜盐放线菌菌株的分类鉴定将在以后的文章做进一步描述。

参考文献:

- [1] Margaret B, Gochnauer G, Leppard G, et al. Isolation and characterisation of *Actinopolyspora holophila*, gen. et. sp. nov [J]. *Can J Microbiol*, 1975, 21: 1500—1511.
- [2] 张永光,李文均,姜成林,等.嗜盐放线菌的研究进展[J].微生物学杂志,2002,22(4):45—48.
- [3] Maltseva O, Oriol P. Monitoring of an Alkaline 2, 4, 6-Trichlorophenol-Degrading Enrichment Culture by DNA Fingerprinting Methods and Isolation of the Responsible Organism, *Haloalkaliphilic Nocardioides* sp. Strain M6 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 4145—4149.
- [4] 唐蜀昆,李文均,张永光,等.嗜盐放线菌生物学特性初步研究[J].微生物学通报,2003,30(4):15—19.
- [5] 李永飞.近 50 年来柴达木盆地升温与全球变暖[J].上饶师范学院学报,2005,25(3):105—109.
- [6] 张继承,姜琦刚,李远华.近 50 年来柴达木盆地湿地变迁及其气候背景分析[J].吉林大学学报(地球科学版),2007,37(4):752—758.
- [7] 程丽娟,薛泉宏.微生物学实验技术[M].西安:世界图书出版西安公司,2000:387.
- [8] 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: 501—509.
- [9] 唐蜀昆,姜怡,职晓阳,等.嗜盐放线菌分离方法[J].微生物学通报,2007,34(2):390—392.
- [10] 土壤农化分析[M].第二版.北京:农业出版社出版,1986:115—137.
- [11] 邹静,米琴,马永贵,等. Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 浓度对嗜盐放线菌生长的影响[J].青海农林科技,2005,3:1—3.

The preliminary investigation of halophilic and halotolerant Actinomycetes in Yushuihe, Qinghai

ZHU Hua¹, LAI Hang-xian², FU Yan-ping¹, XUE Quan-hong², SUN Ting²

(1. Collage of Life Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

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

Abstract: Salt ions and pH value of river water, sediment and sandy soil of Yushuihe were measured in this paper, and some preliminary research on halophilic and halotolerant Actinomycetes have been done through design different media, tapy of salt and addition quantity. The results showed that: all the experimental samples are alkaline; the the highest total content of water-soluble salt is sediment which is 158.67 g/kg, then is sandy soil—90.43 g/kg, river water is the lowest one which is 3.1 g/L; as for salt ions, the highest anion content is Cl^- , while among the cations, K^+ and Na^+ are much higher. Therefore, $NaCl$ and KCl are the main existing forms of salt ions in the samples; 89 strains of Actinomycetes were obtained and most of them were separated from sediment, and the best isolation medium is modified starch casein medium; 8 halophilic Actinomycetes strains were discovered by halophilic and halotolerant Actinomycetes screening, and 3 of them are extreme halophilic Actinomycetes in $NaCl$ while 7 in KCl , and 1 of them is tropic-K Actinomycetes.

Key words: Yushuihe; salt ions; Actinomycetes; halophilic Actinomycetes; screening