

CaCl₂ 对干旱地区钙质土壤放线菌 分离效果的影响

薛清¹, 王玲娜², 段春梅³, 林雁冰²

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学生命学院, 陕西 杨凌 712100;

3. 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 采用稀释平板法研究了高氏1号培养基中加入CaCl₂对钙质土壤放线菌分离效果的影响。结果表明:(1) 加入CaCl₂对干旱区钙质土壤放线菌的出菌量有一定影响, 大部分土壤的放线菌总数较对照增长23.9%~47.0%, 加钙处理与对照的差异达到显著水平($P < 0.05$); 加钙后链霉菌数量有增有减, 增、减幅度分别为17.5%~123.3%、18.0%~42.5%, 减少幅度未达到显著水平($P > 0.05$)。 (2) 向高氏1号培养基中加钙有利于广谱高效拮抗性放线菌的分离。

关键词: 拮抗性放线菌; 分离; CaCl₂; 钙质土壤; 干旱区

中图分类号: S144.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2010)05-0104-04

放线菌是抗生素的主要产生菌, 是抗生素工业赖以生存和发展的微生物资源^[1]。由于各种原因大多数放线菌不能在人工培养基上生长, 已分离出的放线菌仅占其自然界存在总量的10%~20%^[2]。目前, 国内外在放线菌分离方法研究方面已经取得了较大的进展^[3~10]。研究发现, 采用多种物理、化学刺激以及改变培养基成分等措施, 如对土样采用加热或机械等物理处理、改变培养基碳氮源、加入氨基酸、有机酸及维生素等^[11~14], 能有效提高稀有放线菌的出菌率, 并分离出放线菌的新种属^[15~17]。但目前对与生命活动密切相关的各种无机离子对放线菌分离效果的作用重视不够。若要分离到更多的放线菌, 需要探索新的分离方法。

钙离子是生物体内生理活动不可缺少的离子, 具有调节酶活性、传递细胞信号及维持渗透压等多种作用。研究表明, 向酸性土壤中加入碳酸钙, 土壤放线菌数量显著增加^[18], 即钙盐存在能增加土壤放线菌数量, 钙离子对放线菌生长可能有重要影响。但在培养基中增加钙离子含量能否增加放线菌的出菌量, 国内外尚无报道。本文重点研究向高氏1号培养基中加钙对北方干旱半干旱地区钙质土壤放线菌分离效果的影响, 旨在探索新的放线菌分离培养基, 以期从西北干旱区钙质土壤中分离获得更多可培养、具有产生新生物活性物质的放线菌新种属。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 土壤类型为栗钙土, 采自内蒙古自治区太仆寺旗(41°35'~42°10'N, 114°51'~115°49'E)宝昌镇永胜村西芹田。其中1~3号土样为风干土样, 4号土样为4℃冰箱保存的湿土样。供试土壤基本性质见表1。土壤pH用DELTA 320pH计测定^[19], 有机质用重铬酸钾氧化-外加加热法测定^[19], 碳酸钙用盐酸气量法测定^[19]。

表1 供试土壤化学性质

Table 1 The chemical properties of the test soil

土样编号 Soil sample No.	pH	有机质(g/kg) Organic matter	碳酸钙(g/kg) CaCO ₃
1	8.47 ± 0.15	54.46 ± 5.11	40.68 ± 0.86
2	8.80 ± 0.64	59.44 ± 0.76	29.66 ± 0.88
3	8.18 ± 0.04	57.48 ± 4.91	31.96 ± 0.12
4	8.03 ± 0.13	66.03 ± 0.33	37.74 ± 0.12

1.1.2 培养基 放线菌分离培养基: 高氏1号培养基(GA)^[20]; 高氏1号加钙培养基(GACa): 普通高氏1号培养基加5 g/L CaCl₂。以上培养基倒皿之前均加入灭菌K₂Cr₂O₇至80 μg/mL, 以抑制细菌及真菌生长。靶标菌培养和拮抗性测定采用PDA培养基^[20]。

收稿日期: 2010-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(40701095, 40971171); 西北农林科技大学“大学生创新实验计划项目”(2008021)

作者简介: 薛清(1988—), 男, 陕西白水人, 专业方向为植物保护。E-mail: xueqing2004@126.com。

通讯作者: 林雁冰(1976—), 女, 吉林白山人, 讲师, 研究方向为微生物生态及放线菌资源与利用研究。E-mail: linyb2004@yahoo.com.cn。

1.1.3 供试靶标菌 均为植物病原真菌,共 10 株,分别为接骨木镰刀菌(*Fusarium sambucinum*,缩写为 FS),链格孢菌(*Alternaria alternata*,缩写为 AA),棉花枯萎菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum*,缩写为 FOV),芬芳镰刀菌(*Fusarium redolens*,缩写为 FR),黄瓜萎蔫菌(*Plectosphaerella cucumerina*,缩写为 PC),木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*,缩写为 FE),西瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*,缩写为 FON),大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*,缩写为 VD),镰刀菌(*Fusarium* sp,缩写为 FU)及疫霉菌(*Phytophthora* sp.,缩写为 PH)。以上菌株由西北农林科技大学资源环境学院微生物资源研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 土样处理 将采集的 1、2、3 号土样用吸水纸覆盖装土壤的自封袋袋口,在自然状态下风干 20 d,4 号土样以湿土的形式直接放入 4℃冰箱保存。使用前 1~3 号风干土样用灭菌橡胶塞将其碾磨至细粉状,取 5.0 g 土样加 95 ml 无菌水制成悬液;另取 4 号湿土样 5.0 g,加 95 ml 无菌水制成悬液,同时测其水分系数,以干土计算结果。

1.2.2 放线菌分离测数 将处理好的土壤悬液用 10 倍稀释法稀释,充分混匀后分别吸取 0.1 ml 于 GA、GACa 平板上,用刮铲涂匀后在 28℃下倒置培养 10 d,测数,并根据菌落形态特征将具有链霉菌和小单孢菌菌落特征的放线菌暂定为“链霉菌属”和“小单孢菌属”,其余放线菌皆归入“未鉴定属”,同时挑取放线菌单菌落于高氏 1 号斜面管中培养并保存。

1.2.3 放线菌拮抗性测定 采用琼脂块法^[19]。

1.2.4 数据处理 钙处理增率:用△Ca 表示,指加 CaCl₂ 培养基上的放线菌数量与对照培养基上的放线菌数量的相对增率,计算公式为:

△Ca(%) = (GACa - GA) / GA × 100

式中,GA、GACa 分别代表在高氏 1 号、加钙高氏 1 号培养基上的放线菌数量。

抗菌谱比率 RAS(The Rate of Antifungal Spectrum):指拮抗性放线菌抑制的病原靶标菌种数占供试靶标菌总数的比例,计算公式为:

RAS(%) = n / N × 100

式中,N、n 分别代表供试靶标真菌总株数、受放线菌抗生素抑制的靶标真菌株数。

试验数据显著性分析采用 DPS 9.5 数据处理系统(T-检验)完成。

2 结果与分析

2.1 CaCl₂ 对放线菌分离数量的影响

由表 2 可以看出,GACa 培养基上出现的放线菌总数较对照 GA 显著增加,其中 1、2 号风干土及 4 号湿土的放线菌总数分别较对照增长 23.9%、29.3%及 47.0%,与对照的差异达到显著(P<0.05)和极显著水平(P<0.01),3 号土在 GACa 培养基上出现的放线菌总数较对照 GA 增加 21.0%,二者的差异在统计上未达到显著水平。

表 2 CaCl₂ 处理放线菌分离数量(10⁵cfu/g)
Table 2 The quantity of actinomycetes after adding CaCl₂

土样编号 Soil sample No.	培养基 Media	放线菌总数 Total quantity of actinomycetes	链霉菌属 Streptomyces	小单孢菌属 Micromonospora	未鉴定属 Unidentified genus
1	GA	11.97±1.37	3.43±0.49	0.57±0.58	7.97±1.42
	GACa	14.83±0.83*	4.03±1.11	0.30±0.10*	10.50±1.83
	△Ca(%)	23.9	17.5	-47.4	31.7
2	GA	13.20±1.25	3.00±0.46	0.37±0.21	9.83±0.98
	GACa	17.07±2.38*	6.70±1.01**	1.40±0.30**	8.97±1.59
	△Ca(%)	29.3	123.3	283.6	-8.7
3	GA	7.87±0.91	4.00±0.82	0.73±0.15	3.13±1.70
	GACa	9.53±0.25	2.30±0.17	1.47±0.64	5.77±0.76
	△Ca(%)	21.1	-42.5	101.4	84.3
4	GA	60.71±1.11	13.45±1.16	5.96±4.04	41.30±2.53
	GACa	89.27±1.48**	11.03±2.53	14.22±2.07*	64.01±4.96**
	△Ca(%)	47.0	-18.0	138.6	55.0

注:表中*、**分别表示加钙处理与对照的差异达到显著(P<0.05)、极显著水平(P<0.01)。

Note: The * and ** indicate the differences between the medium of CK and the medium of adding CaCl₂ are significant at 5% level and 1% level, respectively.

链霉菌属在加 CaCl_2 处理后数量变化呈现多样化。如 1 号和 2 号土样较对照分别增加 17.5%、123.3%,其中 2 号土在 GACa 培养基上的链霉菌数量与对照 GA 的差异达到极显著水平($P < 0.01$),1 号土加钙处理链霉菌数虽有增加,与对照的差异不显著;3 号和 4 号土样较对照分别减少 42.5%、18.0%,但均未达到显著水平。

在加入 CaCl_2 后,2、4 号土样的小单孢菌属数量较对照分别增加 283.6%、138.6%,其差异分别达到极显著($P < 0.01$)、显著水平($P < 0.05$),1 号土壤加钙处理的小单孢菌较对照减少 47.4%,且达到显著水平($P < 0.05$)。对未鉴定放线菌而言,4 号土在 GACa 培养基上的数量与对照 GA 培养基上的差异

达到极显著水平($P < 0.01$),其余 3 个干土样均不显著。以上结果表明,在高氏 1 号培养基中加入 CaCl_2 对大部分可培养放线菌数量增加有一定促进作用。

2.2 CaCl_2 对拮抗放线菌分离效果的影响

2.2.1 拮抗放线菌数量 从 GA 和 GACa 培养基上共分离得到 215 株放线菌,以 10 株供试病原真菌为靶标,利用琼脂块法进行筛选,共获得 34 株拮抗性放线菌。由表 3 可以看出,在 34 株拮抗放线菌中,来自普通高氏 GA 和 GACa 培养基上的菌株数分别为 15、19 株,占拮抗菌总数的 44.1%和 55.9%,加钙后拮抗菌株数较对照增长 26.7%。

表 3 不同培养基的拮抗菌及强拮抗菌数量

Table 3 The total quantity of antimicrobial actinomycetes (TAA) and strong antimicrobial actinomycetes (SAA) on the GA and GACa

项目 Item	数量(株) Quantity(Strains)	培养基 Media				
		GA	%	GACa	%	$\Delta\text{Ca}\%$
拮抗菌总数 TAA	34	15	44.1	19	55.9	26.7
强拮抗菌($d \geq 18\text{ mm}$)SAA	9	2	22.2	7	77.8	250.5

2.2.2 强拮抗放线菌数量 由表 3 可以看出,加入 CaCl_2 增加了强拮抗性放线菌数量。其中,从 GACa 和 GA 培养基上获得的强拮抗性放线菌分别为 7 株和 2 株,分别占强拮抗性放线菌的 77.8%和 22.2%,从 GACa 上获得的强拮抗放线菌的株数为对照 GA 的 2.5 倍。由此可见,向高氏 1 号培养基中加钙有利于强拮抗性放线菌的分离,其促进机理有待进一

步研究。

2.2.3 广谱性拮抗放线菌数量 在筛选得到的 34 株拮抗性放线菌中,对 3 种以上靶标菌有抗性的广谱拮抗菌共 10 株。由表 4 可见,分离自 GACa 培养基的广谱拮抗菌 8 株,占强拮抗性放线菌的 80%,从 GA 培养基上分离到的强拮抗性放线菌仅 2 株,占强放线菌总数的 20%,即从 GACa 培养基上分离

表 4 10 株广谱拮抗放线菌对靶标真菌的抗性

Table 4 The antimicrobial activity of the 10 strains broad-spectrum antimicrobial actinomycetes (AA) against target fungi

拮抗菌 AA		RAS (%)	对靶标菌的拮抗圈直径(mm) Antagonistic circle diameter against target fungi									
来源 Source	菌株编号 Strain No.		FS	AA	FOV	FR	PC	FE	FON	VD	FU	PH
GACa	C2g409	60	23	0	16	15	0	20	17	0	14.5	0
	C1g4101	60	15	11	0	0	13	15	0	11	26	0
	M3g407	50	21	0	21	0	0	24	16	0	9	0
	C1g4307	40	0	12	20	0	15	0	0	0	17	0
	M2g407	40	0	0	10	0	0	15	14.5	0	14	0
	C4g402	40	0	0	0	12	0	20	0	0	13	23
	C3g411	30	12	10	11.5	0	0	0	0	0	0	0
	C4g413	30	0	0	0	0	17	18	0	0	24	0
	株数 Strains(株)		4	3	5	2	3	6	3	1	7	1
	百分数 Percentage(%)		66.6	100	83.3	100	100	85.7	100	100	87.5	50.0
GA	C1G419	30	23	0	0	0	0	0	0	0	11	15
	M4G406	30	10	0	10	0	0	10	0	0	0	0
	株数 Strains(株)		2	0	1	0	0	1	0	0	1	1
	百分数 Percentage(%)		33.3	0	16.7	0	0	14.3	0	0	12.5	50.0

到的广谱拮抗放线菌数量远高于GA培养基。其中抗菌谱RAS达40%以上的6株拮抗菌100%来自GACa,对5株靶病原真菌AA、FR、PC、FON及VD有拮抗性的放线菌100%来自GACa。由此可见,CaCl₂的加入有助于分离出更多广谱拮抗放线菌。

3 结论与讨论

分子生物学方法已经证明,自然界实际存在的放线菌数量远多于可分离培养的放线菌数量,其中有大量的放线菌按现有方法难以培养。获得这些难培养放线菌对放线菌研究与资源利用有重要意义,探索新的分离方法是解决这一问题的根本途径。Okami^[21]认为酵母膏等可活化土壤放线菌的休眠孢子,增加放线菌分离数量;姜怡等^[11]向土壤悬液中加入6%的酵母膏和0.05%的SDS混合液,在40℃处理20min,能有效分离到小单孢菌属、链孢囊菌属、马杜拉菌属及小双孢菌属等稀有放线菌;杨宇容等^[15]采用多种不同的碳、氮源或改变其相对比例,增加了土壤放线菌分离种类。贾学文^[22]等采用不同直径玻璃珠撞击土壤悬液也增加了放线菌的种类和数量。杨斌等^[23]发现,微波处理对可培养放线菌中拮抗性放线菌有明显影响。本试验提出在培养基中加入CaCl₂改善分离效果的设想,研究了加入CaCl₂对钙质土壤放线菌总数、链霉菌属、小单孢菌属、未鉴定属数量及对拮抗性放线菌的影响,发现向高氏1号培养基上加入CaCl₂后大部分供试土壤的放线菌总数及拮抗放线菌数量增加,强拮抗性广谱拮抗性菌株增加。

我国西北大部分地区属于干旱半干旱区,土壤中含钙量均较高。本研究结果对开发干旱区钙质土壤放线菌资源,尤其是拮抗性放线菌有重要意义。CaCl₂加入对土壤放线菌尤其是拮抗性放线菌的分离效果有促进作用,但其机制尚待研究。

参考文献:

- [1] 刘志恒.放线菌—微生物药物的重要资源[J].微生物学通报,2005,32(6):143—145.
- [2] 张纪忠,黄静娟,盛宗斗,等.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社,1985:214—218.
- [3] Bulina T I, Alferova I V, Terekhova L P. A novel approach to isolation of actinomycetes involving irradiation of soil samples with microwaves[J]. Microbiology, 1997,66(2):231—234.
- [4] Hayakawa M, Sadakata T, Kajiura T, et al. New methods for the highly selective isolation of micromonospora and microbispora from soil[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991,72(5):320—326.
- [5] Hayakawa M, Kajiura T, Nonomura H. New methods for the highly selective isolation of streptosporangium and dactylosporangium from soil[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991,72(5):327—333.
- [6] Hayakawa M, Tamura T, Nonomura H. Selective isolation of actinoplanes and dactylosporangium from soil by using collidine as the chemo attractant[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991,72(6):426—432.
- [7] Hayakawa M, Tamura T, Iino H, et al. Pollen-baiting and drying method for the highly selective isolation of actinoplanes spp. from soil[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1991,72(6):433—438.
- [8] Hayakawa M, Momose Y, Kajiura T, et al. A selective isolation method for Actinomadura viridis in soil[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995,79(3):287—289.
- [9] Hendricks C W, Pascoe N. Soil microbial biomass estimates using 2450 MHz microwave irradiation[J]. Plant and Soil, 1988,110(1):39—47.
- [10] 沈玲,郭正彦,吴文君.极端环境中分离放线菌的方法[J].西北农业学报,2005,14(5):146—149.
- [11] 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,2006,33(1):181—183.
- [12] Li Y V, Terekhova L P, Gapochka M G. Isolation of actinomycetes from soil using extremely high frequency radiation[J]. Microbiology, 2002,71(1):105—108.
- [13] Li Y V, Terekhova L P, Alferova I V, et al. The application of succession analysis in combination with EHF irradiation to the selective isolation of actinomycetes from soil[J]. Microbiology, 2003,72(1):114—117.
- [14] Likhacheva A A, Komarova A S, Luk'yanov A A, et al. The Influence of SHF radiation on soil streptomycetes[J]. Eurasian Soil Science, 2006,39(8):854—858.
- [15] 肖炜,李铭刚,崔晓龙,等.几种选择性分离稀有放线菌的方法[J].微生物学通报,2006,33(1):133—137.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Jensen H L. Actinomycetes in Danish soils[J]. Soil Sci,1930,30:59—77.
- [19] 鲍士旦.土壤化学分析[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [20] 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.
- [21] Okami Y. Concepts and techniques for isolation and characterization of actinomycetes[A]. SIM - ISBA' 91 Workshop on Actinomycetes [C]. Madison: University of Wisconsin,1991:1—3.
- [22] 贾学文,闫伟,白淑兰,等.根际土壤微生物最佳分离条件筛选研究[J].华北农学报,2007,22(6):147—151.
- [23] 杨斌,薛泉宏,陈占全,等.微波处理对土壤放线菌分离效果的影响[J].应用生态学报,2008,19(5):1091—1098.

(英文摘要下转第114页)

Experiments on accumulation and chemical forms of Cd, Pb, Zn and Ni in arid oasis soils

LIAO Qin, WANG Sheng-li, NAN Zhong-ren, WU Wen-fei, ZHOU Ting,

JIN Wang-qiang, ZHAO Cui-cui, LIU Jiao

(Key Laboratory of Western China's Environment (Ministry of Education), College of Resources and Environment Sciences, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

Abstract: Pot experiment was conducted to study the absorption and accumulation characters of Cd, Pb, Zn and Ni on the growth of celery and the chemical forms of selected heavy metals in arid oasis soils. The results showed that the accumulation rate order of heavy metals from soil to the celery was $Cd > Zn > Ni > Pb$, and the concentration of heavy metals in the root was higher than that in leaves. The chemical form contents of metal Pb, Zn and Ni mainly existed in residual fraction in untreated soils, while Cd mainly existed in Fe - Mn oxides bound form. With the increase of exotic heavy metals, the existence of Cd mainly was in the forms of carbonate, carbonate forms and Fe - Mn oxides bound forms to element Pb, and Fe - Mn oxides bound forms to metal Zn and Ni. According to the results of regression analysis, it was found that EX - Cd made significant contribution to the accumulation of Cd in the leaves of celery, EX - Pb and EX - Zn to the accumulation of Pb and Zn in both tissues, and FMO - Ni to the accumulation of Ni in the root of celery.

Keywords: oasis soils; heavy metals; celery; absorption and accumulation; speciation

(上接第 107 页)

The influence of adding $CaCl_2$ on the isolation of actinomycetes from calcareous soil in arid areas

XUE Qing¹, WANG Ling-na², DUAN Chun-mei³, LIN Yan-bing²

(1. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

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

Abstract: Dilution plate method was employed to study the effects of adding $CaCl_2$ into Gause's No.1 medium on the isolation of actinomycetes from calcareous soil. The result showed that: (1) The total quantity of the actinomycetes isolated from calcareous soil in arid areas could be affected by $CaCl_2$. The total quantity of the actinomycetes was increased from 23.9% to 47.0% mostly. The difference between treatments and the control was significant at 5% level. The effect on the total quantity of the streptomycete was different from that of actinomycetes. The increase range was from 17.5% to 123.3%, while the decrease range was from 18.0% to 42.5% compared with the control. But the decrease wasn't significant at 5% level ($P > 0.05$). (2) Adding $CaCl_2$ into Gause's No.1 medium increased the quantity of broad-spectrum with strong antimicrobial antinomycetes.

Keywords: antagonistical actinomycetes; isolation; $CaCl_2$; calcareous soil; arid areas