

# 藏东南地区土壤放线菌的生态分布及活性研究

何建清<sup>1,2</sup>, 吴云锋<sup>1\*</sup>, 张格杰<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>西北农林科技大学植保学院 陕西省农业分子生物学重点实验室 杨陵 712100)

(<sup>2</sup>西藏大学农牧学院 林芝 860000)

**摘 要** 从藏东南原始森林、高山草甸、沼泽、粮田与保护地等不同植被、从 2970~4590m 不同海拔高度采集土样 50 份,用多种培养基分离中、低温放线菌,并对放线菌的数量、组成、生理生化特性以及它们的拮抗性等进行了研究。按放线菌的形态学特征进行了鉴定。结果表明:①从藏东南各种土壤中放线菌分离到 9 个属,其中束丝菌属在国内未见报道。以粮田中放线菌的数量和种类最多。②原始森林中拮抗性放线菌数量最多,提供了从原始森林土壤中可以筛选到更多拮抗性放线菌的重要信息。③抗革兰氏阳性细菌的放线菌菌株数较抗革兰氏阴性细菌的多,拮抗真菌的放线菌菌株数比拮抗细菌的多。④藏东南土壤链霉菌具有许多酶活性。

**关键词**: 藏东南地区,放线菌分布;拮抗性

中图分类号:Q938 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2006)05-0773-05

藏东南地区大致是西起米拉山—加查一线,东至伯舒拉岭,北临念青唐古拉山,南与缅甸、印度接壤,处于雅鲁藏布江中下游的广阔地带。该区气候宜人,资源丰富,素有“西藏的江南”、“天然的自然博物馆”、“雪山和森林的世界”之美誉。藏东南平均海拔 3100m,地势北高南低,印度洋暖流北上,与北方寒流汇合,形成了热带、亚热带、温带和寒带并存的特殊气候。年降雨量 650mm 左右,为西藏自治区内的多雨区,年均温度 8.7℃左右,年均日照 2022.2h,夏无酷暑,冬无严寒,雨量充沛,气候湿润,日照长,霜期短。前人研究指出,微生物的分布与土壤、植被等生态因子密切相关<sup>[1]</sup>。现已逐步形成一种新的看法,新地方,新方法,新菌种,新菌种必然有新基因,新产物,新活性和新用途,是药物开发的重要来源<sup>[2]</sup>。藏东南地域辽阔,地形复杂,气候多样,植被丰富,其中必然蕴藏有大量具有重要经济意义和潜在开发前景的新型抗生素和其他物质产生菌,研究该地区放线菌的生态分布规律及其活性,对于放线菌资源的开发利用具有重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土壤样品** 2005 年 4~7 月从西藏的色季拉山、林芝县、米林县、工布江达县、米拉山等地,根据

不同植被、不同海拔高度采集土样 50 份(表 1)。采样深度为 0~20cm,5~10 点混和为一份样品。将所采样品带回实验室风干、研碎、过筛,7d 内分离菌种。

**1.1.2 培养基** 选择分离培养基参照文献[3],中温菌培养基用甘油精氨酸琼脂、察氏琼脂和高氏一号培养基,低温菌培养基用土壤浸汁琼脂和葡萄糖天门冬素琼脂培养基,为抑制真菌和细菌,在培养基中加入 50μg/mL 重铬酸钾。

**1.1.3 测试菌** 试验菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、番茄早疫病(*Alternaria solani*)、南瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporium*)、苹果炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)来自西北农林科技大学植物病理教研室。

**1.1.4 主要试剂和仪器** SDS、重铬酸钾、精氨酸、酪素等均为国产试剂;Olympus 显微镜, pHHS-29A 酸度计等。

### 1.2 土样预处理和分离方法

参照文献[4],土样风干后,120℃干热 1h,土样稀释 10 和 100 倍,再加 0.05% 的 SDS,40℃悬浮 30min,采用平板涂布法进行分离。将平板置于 28℃、8℃培养,7d、30d 后挑菌。

基金项目:国家自然科学基金(30571214);西北农林科技大学研究生教育创新计划(05YCH005)

\* 通讯作者。Tel: 86-29-87091389; E-mail: wuyf@nwsuaf.edu.cn

作者简介:何建清(1971-),女,四川南充人,硕士研究生,从事微生物生态及生物防治方面研究。E-mail: hejq71@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-11-07;接受日期:2006-03-07;修回日期:2006-02-13

表 1 土样记录

Table 1 Note of soil samples

No. of Sampling area	Place	Vegetative type and uses	Number of samples	Altitude/m	Soil		
					Type	pH	Organic matter/%
I	Sejila Mountain	Primeval forest grow Alpine pine and Abies	8	2970 ~ 3650	Sylvogenci soil	6.2	6.2
II	Linzhi region	Grainfield grow Hordeum uhulgare L., Triticum aestivum	10	3040 ~ 3280	Sandy loam	6.9	2.5
III	Linzhi region	protectorate field grow Solanaceae, Cruciferae vegetable	9	2970 ~ 3080	Sandy loam	5.2	2.2
IV	Sejila Mountain	Rhodiola rosea Rhodiola crenulate and Rhododendron nivale	3	4260 ~ 4570	Alpine scrubland meadow soil	5.5	7.2
V	Milin region	Wasteland grow Gramineae weed, Artemisia sieversiana Willd	6	2910 ~ 2970	Sandy loam	6.5	1.3
VI	Mila Mountain	Alpine meadow grow Thalictrum alpinum L.	4	4250 ~ 4590	Alpine meadow soil	5.7	10.1
VII	Linzhi region	secondary forest grow oak, Barberry Root Radix Berberidis	3	2790 ~ 3200	Sylvogenci soil	6.6	3.7
VIII	Linzhi region	Marshy grow Pedicularis and Primulaceae	3	2970 ~ 3380	Marshy meadow soil	6.6	4.5
IX	Gongbuijiangda region	Farmland grow Triticum aestivum and Brassica campestris L.	4	3410 ~ 3930	Farmland meadow soil	6.7	2.5

1.3 形态和培养特征观察

放线菌经纯化后,用插片法适时取片,光学显微镜观察形态特征,按常规方法鉴定到属<sup>[5-8]</sup>。

1.4 拮抗性测定

参照文献[8]进行。

1.5 中温放线菌生理生化特性测定

淀粉水解、明胶利用、水解酪素和凝乳酶活性根据文献<sup>[8]</sup>的方法测定。

2 结果和讨论

2.1 土壤样品放线菌数量的分布

放线菌在土壤中的分布和数量随土壤环境而异。藏东南不同植被不同利用方式下放线菌总数见表 2。各样区的中温菌数量明显多于低温菌,对中温菌,高氏一号培养基所测数量高于甘油精氨酸培养基,对低温菌,土壤浸汁培养基所测的菌数高于葡萄糖天门冬素培养基。中温放线菌数量以粮田>荒地>次生林>保护地>原始森林>耕作草甸>亚高山草甸>沼泽>高山草甸,其数量依次 1553.1×10<sup>3</sup>、1479.3×10<sup>3</sup>、1473.3×10<sup>3</sup>、820.0×10<sup>3</sup>、536.7×10<sup>3</sup>、184.3×10<sup>3</sup>、19.5×10<sup>3</sup>、9.0×10<sup>3</sup>和 4.8×10<sup>3</sup>个/g 干土。粮田肥力水平高,通气好,采样时正值小麦、青稞收获季节,放线菌数量最高。保护地耕作水平高,土壤肥沃,人为影响大,应适合放线菌的生长,但分离结果表明其中的放线菌在数量上不多,这可能与长期大量使用化肥农药有关<sup>[9]</sup>。从结果还可

知,放线菌的数量与土质有关,砂壤土中放线菌数量最多,其次为山地棕壤,草甸土中放线菌数量最少。砂壤土通气性、透水性良好,有机质含量适中,适于放线菌生长,放线菌数量最高。山地棕壤通气性、透气性较好,腐殖质含量较高,放线菌数量较多;草甸土位于浅凹低洼地带,虽然有机质含量较高,但由于常年积水,表层草本植物生长繁茂,土壤湿度很大,通气性和透气性差,一定程度上抑制了放线菌菌体的生长和活动,所以不是好气放线菌生活的良好环境。从海拔高度来看,海拔不同,成土过程不同,土壤的理化性质亦不同,当直接影响土壤微生物的生存、活动与繁衍,随着海拔的升高,总的数量迅速下降,当海拔在 4000m 以上时,放线菌数量很少。另外,放线菌的数量还受到 pH 值、温度、植被状况等因素的影响。

2.2 土壤放线菌区系组成

2.2.1 中温放线菌的组成 对 9 个样区土样中所分离的放线菌进行分群归类(表 3)。从该地区共分离到 9 个属的放线菌。粮田最多,分离到 7 个属,耕作草甸土最少,只分离到 2 个属。在粮田中分离到束丝菌属(图 1),该属在国内尚未见报道。中温放线菌中,9 个样区中的链霉菌被归入到 12 个类群中。链霉菌的类群在各样区分布不同,但均以灰褐类群和白孢类群占优势,蓝色类群很少,仅在荒地中分离到。该区链霉菌平均占放线菌总数的 90.5%,表明链霉菌属是藏东南土壤放线菌的主要属之一。与云

南高寒山区的放线菌研究结果相比<sup>[10]</sup> ,我们发现了 未发现马杜拉放线菌属 ,说明不同地区由于地理环  
束丝菌属、游动放线菌属<sup>[11]</sup>和原“ 小多孢菌属 ”<sup>[12]</sup> , 境等因素的不同 ,放线菌的组成也不同。

表 2 各样区土壤放线菌数量

Table 2 The numbers of actinomycetes in each sample site				
Sample No.	Mesophilic actinomycetes ( 10 <sup>3</sup> /g dry wt )		Psychrophilic actinomycetes ( 10 <sup>2</sup> /g dry wt )	
	Gause's No. 1 agar	Glycerine arginine agar	Soil lixivium agar	Glucose asparagines agar
I	536.7	287.3	27.1	21.9
II	1553.1	1150.7	113.9	90.4
III	820.0	568.9	12.4	7.9
IV	19.5	17.6	35.9	21.6
V	1479.3	932.7	54.3	40.8
VI	4.7	2.6	10.1	7.8
VII	1473.3	1023.3	105.7	75.5
VIII	9.0	6.5	4.2	2.3
IX	184.3	106.4	6.1	3.7

表 3 藏东南地区放线菌区系组成及分类特征

Table 3 Actinomycete populations and classification characteristics in soil samples from Southeastern Tibet										
Genus	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	Morphological properties
Mesophilic actinomycetes ( 10 <sup>3</sup> /g dry wt )										
<i>Streptomyces</i>	534.0	1549.9	817.5	15.6	1479.3	3.4	1470.8	5.6	182.8	Substrate mycelium branching , well developed non-fragmenting ; aerial mycelium rich , straight , hooked or spiral
%	99.5	99.8	99.6	80.0	99.7	74.8	99.8	62.2	99.2	
<i>Nocardia</i>	0.4	1.4	1.2	0.3	0.3	1.0	2.0	1.3		Substrate mycelium fragmenting , forming aerial mycelium or not
<i>Actinoplanes</i>		0.2								Substrate mycelium forming diaphragm ; sporangium irregular or flowerlike
<i>Intrasporangium</i>		0.1								Substrate mycelium branching , forming sporangia irregular or flowerlike
<i>Actinosynnema</i>		0.1								Substrate mycelium branching , forming rhizomorphs in agar or dome-like bodies on agar , aerial mycelium fragmenting into catenulate spores
‘ <i>Micropolyspora</i> ’				0.7	0.3	0.3	0.3	0.6		Substrate mycelium branching , both types of mycelium forming single spores and short catenulate spores
<i>Micromonospora</i>	1.3	1.1	0.8	1.7	0.7			1.6	1.5	Substrate mycelium forming single spores
<i>Saccharopolyspora</i>	0.1									Substrate mycelium well developed , breaking into bacilliform elements , aerial mycelium forming catenulate spores or diaphragm
<i>Streptosporangium</i>					0.3					Substrate mycelium forming no diaphragm , single chain of spores born on aerial mycelium , chain of spores convolving into sporangia
Psychrophilic actinomycetes ( 10 <sup>2</sup> /g dry wt )										
<i>Streptomyces</i>	26.7	113.2	12.4	35.1	54.3	8.9	105.7	4.2	6.1	Substrate mycelium branching , well developed , non-fragmenting ; aerial mycelium rich , chains of spores straight , hooked or spiral
<i>Nocardia</i>	0.1									Substrate mycelium branching ; forming aerial mycelium or not
<i>Micromonospora</i>	0.3			0.7		1.3				Substrate mycelium forming single spores
<i>Micropolyspora</i>		0.7								Substrate mycelium branching , both types of mycelium forming single spores and short catenulate spores

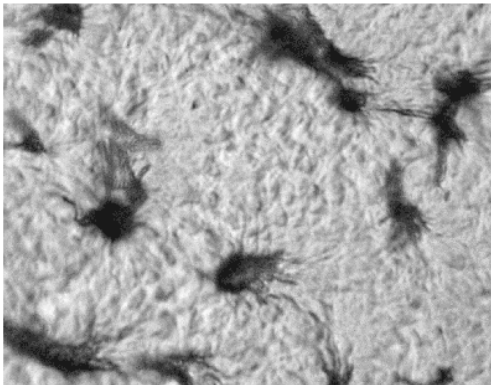


图1 束丝放线菌属的形态特征(400×)  
Fig.1 Morphological characteristics of *Actinosynnema* sp.(400×).

2.2.2 低温放线菌的组成:在9个样区中,低温放线菌分离到4个属。所分离到的低温放线菌主要是链霉菌,稀有放线菌为小单孢菌属、诺卡氏菌属和原“小多孢菌属”,数量很少,只在部分土样中分离到。链霉菌中的低温菌以灰褐类群、白色类群较为常见。

2.2.3 拮抗性放线菌的分布:从9个样区中分离到564株放线菌,对其进行拮抗性测定(表4)。拮抗菌

在9个样区中均有分布。拮抗菌的分布与各样区放线菌的数量无相关性。在564株供试放线菌中,66.1%的菌株具有抗菌活性。原始森林土壤中的拮抗性放线菌百分率最高,为84.0%;亚高山草甸及保护地次之,分别达78.6%和77.5%;粮田、荒地、高山草甸、次生林、耕作草甸的拮抗菌百分率在47%~68%。原始森林放线菌数量虽少,但拮抗性放线菌的百分率却较高,这不仅对原始森林中土传病害的防治有重要意义,而且提供了从原始森林土壤中可以筛选到更多拮抗性放线菌的重要信息。

由表4还可知,藏东南土壤放线菌中,抗革兰氏阳性细菌的放线菌菌株数较抗革兰氏阴性细菌的多,这与薛泉宏等人的研究结果一致<sup>[13]</sup>。拮抗真菌的放线菌菌株数比拮抗细菌的多,与罗红丽等的结果一致<sup>[14]</sup>。这可能是因为藏东南土壤普遍偏酸,适宜真菌的生长,其中的放线菌可能是极具潜力的抗真菌活性物质的产生者。拮抗菌所在的12个类群中,以灰褐类群、灰红紫类群、球孢类群、金色类群为多。

表4 藏东南不同利用方式土壤拮抗性放线菌分布

Sample site	Number of strains tested	Test bacteria			Test fungi				Total of antimicrobes (strain/%)	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Σ Total	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Fusarium oxysporium</i>	<i>Alternaria olani</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Σ Total	
I	94	44(46.8)	53(56.0)	59(62.8)	41(43.6)	37(39.7)	56(59.6)	55(58.5)	78(83.0)	79(84.0)
II	120	54(45.0)	63(52.5)	75(62.5)	49(41.0)	37(30.8)	40(33.3)	51(42.5)	79(65.8)	81(67.5)
III	80	39(48.8)	44(51.5)	42(52.5)	45(56.3)	31(38.8)	35(43.8)	44(55.0)	61(76.3)	62(77.5)
IV	42	18(42.9)	30(71.4)	31(73.8)	25(59.5)	12(28.6)	16(38.1)	14(33.3)	27(64.3)	33(78.6)
V	71	3(4.2)	12(16.9)	12(16.9)	20(28.2)	21(29.6)	25(35.2)	32(45.1)	38(53.5)	40(56.3)
VI	14	0(0)	3(21.4)	3(21.4)	4(28.6)	2(14.3)	5(35.7)	2(14.3)	3(21.4)	5(35.7)
VII	68	4(5.9)	35(51.5)	35(51.5)	19(27.9)	17(25.0)	24(35.3)	19(27.9)	29(42.6)	32(47.1)
VIII	31	0(0)	13(42.0)	13(42.0)	14(45.2)	15(48.4)	12(38.7)	16(51.6)	18(58.1)	19(61.3)
IX	44	5(11.4)	19(43.2)	21(47.7)	16(36.4)	11(25.0)	14(31.8)	15(34.1)	21(47.7)	22(50.0)
总数 Total	564	167(29.6)	281(49.8)	291(51.6)	233(41.3)	183(32.4)	227(40.2)	248(44.0)	354(62.8)	373(66.1)

Note :The numbers outside and inside parenthesis indicate respectively numbers and percentages of antimicrobial actinomycetes of tested ones against the test organisms.

2.4 中温放线菌生理生化特性结果

将分离到的有代表性的150株中温放线菌进行淀粉水解、明胶利用、水解酪素和凝乳酶活性试验(表5)。从表5的结果可以看出,分别有58.7%和

72.0%的中温放线菌能利用明胶和产生凝乳酶,这些放线菌水解淀粉和酪素的能力较弱,分别为22.7%和25.3%。

表5 中温放线菌生理生化特性结果

Table 5 The physiological and biochemical characteristics of tested Mesophilic actinomycetes actinomycetes						
Item	<i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Micostreptospora</i>	Total	Positive/%
Number of strains tested	130	8	7	7	150	100
Decomposition of starch	30	2	1	1	34	22.7
Gelatin liquefaction	87		1	1	88	58.7
Milk-clotting enzyme	108				108	72.0
Decomposition of casein	38				38	25.3

拮抗性及生理生化试验结果表明,藏东南土壤放线菌可产生多种有用物质。因而,对测试的菌进行进一步的研究,筛选出淀粉酶、蛋白酶以及抗生素产生能力强的经济菌株,对开发该地区的放线菌资源具有重要的实践意义。另外,藏东南复杂而独特的生态环境及其较原始的土壤决定了其中的放线菌必然存在着独特之处。本研究分离的束丝放线菌在国内尚未见报道。据报道,束丝放线菌能产生对癌症有疗效的美登素(maytansine)<sup>[7]</sup>,对其深入研究,将具有十分重要的理论与实践价值。

### 参 考 文 献

- [1] 贺鹰搏,臧向莹,张克谦.海南岛几个主要土类在不同利用下放线菌的分布与拮抗性的研究.微生物学报,1965,11(2):244-251.
- [2] 徐丽华,李文均,崔晓龙,等.新疆青海极端环境发现大量未知放线菌.云南大学学报(自然科学版),2003,25(3):283-292.
- [3] 徐丽华,杨宇容,姜成林.云南土壤放线菌生态分布的研究.微生物学报,1996,36(3):220-226.
- [4] 王启兰,曹广民,姜文波,等.青海高寒草甸土壤放线菌区系研究.微生物学报,2004,44(6):733-736.
- [5] Hasegawa T, Lechevalier MP, Lechevalier HA. A new genus of *Actinomycetales*: *Actinosynnemagen*. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1978, 28:304-310.
- [6] 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.
- [7] 阮继生,刘志恒,梁丽糯,等.放线菌研究及应用.北京:科学出版社,1990.
- [8] 阮继生.放线菌分类基础.北京:科学出版社,1977.
- [9] 熊亚南,杨润蕾,宋丽华,等.承德地区放线菌物种多样性分布的研究.河北农业大报,2005,28(4):71-79.
- [10] 姜成林,徐丽华,郭光远,等.云南若干地区土壤放线菌区系及资源考察Ⅴ.高寒山区的放线菌.微生物学报,1988,28(3):198-205.
- [11] Stackebrandt E, Kroppenstedt RM. Union of the genera *Actinoplanes* Couch, *Ampullariella* Couch, and *Amorphosporangium* Couch in a redefined genus *Actinoplanes*. *Syst Appl Microbiol*, 1987, 9:110-114.
- [12] Goodfellow M, Pirouz T. Numerical classification of sporoactinomycetes containing meso-diaminopimelic acid in the cell wall. *J Gen Microbiol*, 1982, 128:503-527.
- [13] 薛泉宏,蔡艳,陈占全,等.青海高原东部土壤中拮抗性放线菌的生态分布特征.中国抗生素杂志,2004,29(4):203-205.
- [14] 罗红丽,黄英,王黎明,等.西藏地区土壤放线菌种群多样性及拮抗活性研究.微生物学报,2005,45(5):724-727.

## Activity and ecological distribution of actinomycetes from soil in the southeastern of Tibet

HE Jian-qing<sup>1,2</sup>, WU Yun-feng<sup>1\*</sup>, ZHANG Ge-jie<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(<sup>2</sup> College of Agriculture and Animal Husbandry, Tibet University, Linzhi 860000, China)

**Abstract** The soil samples were collected from primeval forest, alpine meadow, marshy, grainfield and vegetable farmland ect. 9 different kinds of Vegetative type and from 2970 ~ 4590 altitude of southeastern of Tibet. The amount, composition, antimicrobial activity of mesophilic and psychrophilic actinomycetes and some mesophilic actinomycetes of physiological and biochemical characteristics were studied by normal methods. These actinomycetes were identified at genus level by their morphological properties. Results indicated that: (1) 9 genus of actinomycetes were isolated from soil and *Actinosynnema* was never reported in China. Grain field contains the largest quantity of actinomycetes. (2) Primeval forest contains the largest quantity of antimicrobial actinomycetes, so more and more antimicrobial actinomycetes information can be obtained from them. (3) The strains tested had stronger antimicrobial activity against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria, had stronger antimicrobial activity against fungi than bacteria. (4) Many strains of *streptomyces* have some enzyme activities such as gelatin utilization, Milk-clotting enzyme etc.

**Keywords**: Southeastern of Tibet; Actinomycete ecological distribution; Antimicrobial activity