

嗜碱放线菌生理学特性的初步研究*

张永光 唐蜀昆 李文均 徐丽华 姜成林

(云南大学省微生物研究所教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)

摘要: 对从新疆、青海采集的盐碱土样中分离获得的 29 株嗜碱放线菌 (alkaliphilic actinomycetes) 及 1 株模式菌株 *Nocardiopsis prasina* 的 pH 实验, 不同碱性物质 KOH、 K_2CO_3 、NaOH、 Na_2CO_3 对生长的影响, 及对 NaCl、KCl 耐受性进行了研究。结果发现, 少数嗜碱放线菌对 Na^+ 有一定的依赖性, 对 K^+ 碱性物质敏感; 一些嗜碱放线菌对 CO_3^{2-} 敏感, NaCl、KCl 对一些嗜碱放线菌的生长有抑制作用; 4 种碱性物质对 *Nocardiopsis* 菌株生长无影响, 且它们可耐受高浓度 NaCl、KCl。因此提出高碱性环境中是否存在 K^+ 、 CO_3^{2-} 专一性依赖的嗜碱放线菌的推测。

关键词: 嗜碱放线菌, 碱性物质, Na^+ 依赖性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 01-0030-06

PRELIMINARY STUDIES ON PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ALKALIPHILIC ACTINOMYCETES

ZHANG Yong-Guang TANG Shu-Kun LI Wen-Jun XU Li-Hua JIANG Cheng-Lin

(The Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, P. R. China,
Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract: pH, affects of different alkaline materials KOH, K_2CO_3 , NaOH, Na_2CO_3 on the growth, and NaCl, KCl tolerance of 29 isolates from the saline and alkaline soils in Xinjiang and Qinghai Provinces of China and 1 type strain were studied. Results showed that only a few alkaliphilic actinomycetes were Na^+ -obligately dependent, and K^+ -sensitive. Some alkaliphilic actinomycetes were CO_3^{2-} -sensitive, and NaCl, KCl could inhibit their growth. 4 kinds of alkaline materials had no affect on growth of alkaliphilic *Nocardiopsis*, and these strains showed high tolerance to NaCl, KCl. So it was presumed that only K^+ and CO_3^{2-} obligately dependent alkaliphilic Actinomycetes maybe exist in alkaline environments.

Key words: Alkaliphilic Actinomycetes, Alkaline materials, Na^+ -obligately dependent

能在高碱性环境中生存的一类放线菌, 我们称之为嗜碱放线菌。嗜碱放线菌可以产生多种碱性酶和生物活性物质, 如抗生素^[1,2]和酶的抑制剂^[3]。嗜碱放线菌的定义可参照嗜碱菌的定义^[4]。嗜碱放线菌是极端环境中的一个特殊类群, 由于其产物的特殊性和广阔的应用前景, 引起了国际上许多微生物学者的广泛关注。

较早报道嗜碱放线菌是日本的 Mikami^[5], 随后嗜碱放线菌的分类和应用有一些报道。截至现在, 有效发表的嗜碱放线菌仅有一个属和 3 个种^[6]。从碱性环境中分离到的放线菌大多数属于 *Nocardiopsis* 属, 之所以难分离到新物种, 主要因为我们对嗜碱放

* 国家科技部基础研究重大项目 (No.2001CC000600)

云南省自然科学基金项目 (No.2001C0001Q, No.2000C0014M)

云南省教育厅基金项目 (No.01111134, No.02QJ077)

教育部微生物资源开放研究重点实验室开放基金资助

收稿日期: 2002-12-30, 修回日期: 2003-02-18

线菌的生理学、营养需求等都不了解。因此这极大地限制了我们对嗜碱放线菌资源的开发利用,限制了我们对嗜碱放线菌的认识。

嗜碱放线菌生理学研究目前国内外尚未见这方面的报道。在培养嗜碱放线菌时,普遍使用 Na_2CO_3 来调节培养基的 pH 值,若用其他碱性物质调节 pH 值,嗜碱放线菌的生长是否会受到影响?另外已有人报道,嗜碱放线菌往往同时耐盐。我们为了验证其他碱性物质是否对嗜碱放线菌生长产生影响及其耐受盐特性,研究了 29 株从新疆、青海的盐碱土样中分离得到的嗜碱放线菌及 1 株模式菌株 *Nocardiopsis prasina* 的 pH,不同碱性物质 (KOH 、 K_2CO_3 、 NaOH 、 Na_2CO_3) 对生长的影响,及 NaCl 、 KCl 耐受性。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

G-Q-14、80038、80125、80129、80130、80133、80136、80137、80138、80147、80165、80166、80169 为 2000 年从青海、新疆盐碱土样中分离到的嗜碱菌;80173、80199、80203、80244、80245、80250、80254、80256、80263、80305 为 2001 年从青海盐湖泥样中分离到的嗜碱菌;1 株模式菌株嗜碱放线菌 *Nocardiopsis prasina* (ATCC35940^T)。

1.2 实验方法

1.2.1 pH 实验: 选用麦芽膏-酵母膏琼脂培养基 (ISP2) 为基础培养基,下同。所用的缓冲液如下, pH6.0、7.0、8.0 的 0.1 mol/L KH_2PO_4 -0.1 mol/L NaOH , pH9.0、10.0 的 0.1 mol/L NaHCO_3 -0.1 mol/L Na_2CO_3 , pH11.0 的 0.05 mol/L Na_2HPO_4 -0.1 mol/L NaOH , pH12.0 的 0.2 mol/L KCl -0.2 mol/L NaOH 。28℃ 液体培养,10d 观察 1 次,至 30d。实验重复 2 次。

1.2.2 不同碱性物质对嗜碱放线菌生长的影响: 培养基灭菌后,分别用饱和 NaOH 、 Na_2CO_3 、 KOH 、 K_2CO_3 溶液调至相应的 pH 值 (8.0 ~ 12.0),倒平板。接种,28℃ 培养,每 10d 观察 1 次,至 30d。实验重复 2 次。

对 Na^+ 依赖的嗜碱放线菌实验 在用 KOH 、 K_2CO_3 调节的不同 pH 值 (8.0 ~ 12.0) 基础培养基上,分别添加 1.0%、2.0%、3.0% 的 NaCl ,28℃ 培养,每 10d 观察 1 次,至 30d。实验重复 2 次。

对 CO_3^{2-} 敏感的嗜碱放线菌实验 在基础培养基中添加 1% Na_2CO_3 、 K_2CO_3 ,测量 pH 约为 10.0,然后用 NaOH 、 KOH 分别调到相应的 pH 值。接种,28℃ 培养,每 10d 观察 1 次,至 30d。实验重复 2 次。

1.2.3 耐盐性实验: 基础培养基中分别添加 0、3%、5%、7%、10%、15%、20% 的 NaCl 、 KCl ,后用 NaOH 调至 pH10,倒平板。接种,28℃ 培养,每 7d 观察 1 次,至 21d。实验重复 2 次。

2 结果与讨论

2.1 pH 实验

菌株 G-Q-14、80038、80133、80136、80137、80138、80147、80165、80166、80173 的 pH 生长范围为 6.0 ~ 12.0;其余 20 株菌的 pH 生长范围为 7.0 ~ 12.0。除了 80166 的最适生长 pH 在 8.0 ~ 9.0,余下 29 株菌的均在 9.0 ~ 10.0。

表1 不同碱性物质对嗜碱放线菌 pH 生长范围的影响

菌号	属	NaOH (pH)	Na ₂ CO ₃ (pH)	KOH (pH)	K ₂ CO ₃ (pH)
80244	<i>Streptomyces</i>	7~12	7~11	7~8	7~8
80250	<i>Streptomyces</i>	7~12	7~11	7~8	7~8
80305	<i>Streptomyces</i>	7~12	7~11	7~8	7~8
G-Q-14	<i>Streptomyces</i>	7~12	7~10	7~12	7~11
80038	<i>Streptomyces</i>	7~12	7~10	7~12	7~11
80136	<i>Streptomyces</i>	7~12	7~10	7~12	7~10
80137	<i>Streptomyces</i>	7~12	7~10	7~12	7~10
80138	<i>Streptomyces</i>	7~12	7~10	7~12	7~10
80147	<i>Streptomyces</i>	7~12	7~10	7~12	7~10
80165	<i>Streptomyces</i>	7~12	7~9	7~12	7~10
80166	未定	7~12	7~10	7~12	7~10
80125	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80129	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80130	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80133	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80151	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80169	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80173	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80174	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80181	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80182	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80191	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80199	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80203	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80245	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80251	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80254	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80256	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
80263	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
ATCC	<i>Nocardiopsis</i>	7~12	7~12	7~12	7~12
35940 ^T					

2.2 不同碱性物质对生长的影响

依据不同碱性物质调节不同 pH 值下 30 株菌的生长情况 (见表 1), 可以把它们分为 3 个类型: 对 Na⁺ 依赖型; CO₃²⁻ 敏感型; 广谱型。

(1) Na⁺ 依赖型: 菌株 80244、80250、80305 在没有 Na⁺, 即用 KOH、K₂CO₃ 调节 pH 的碱性培养基上, 在 pH8.0 以下有微弱生长, 在 pH8.0 以上均不生长。但它们在用 NaOH、Na₂CO₃ 调节 pH 的碱性培养基上, 除了在用 Na₂CO₃ 调的 pH12 不生长外, 均可生长。结果表明这 3 株菌对 Na⁺ 有一定的依赖性, 特别是在高碱性 pH 培养基中。在高碱性 pH, K⁺ 抑制它们的生长。嗜碱放线菌对 Na⁺ 依赖性可能同嗜碱 *Bacillus* sp. 一样, Na⁺ 在嗜碱 *Bacillus* sp. 的嗜碱性中起着决定作用^[7]。

进一步的实验发现 (见表 3), 菌株 80244、80250、80305 在添加有 1.0%、2.0%、3.0% NaCl 的、用 KOH 调节的基础培养基上, 它们的 pH 生长范围增大, 在 pH8~11 均可生长, 菌株 80244 还可在 pH12 生长; 当用 K₂CO₃ 调节时, 3 株菌仅能在 pH8~9 可以生长, pH 生长范围增大幅度没有用 KOH 的大。可能 CO₃²⁻ 对这 3 株菌的生长也有影响。

(2) CO₃²⁻ 敏感型: 在 NaOH、KOH 调节的不同 pH 培养基上, 菌株 G-Q-14、80038、80136、80137、80138、80147、80165、80166 在 pH7~12 均可以生长, 但在 Na₂CO₃、

K₂CO₃ 调节 pH 的碱性培养基上, 仅能在 pH10 以下生长。显然 CO₃²⁻ 对它们的生长有影响。

表 2 NaCl、KCl 耐性实验

菌号	NaCl 最高耐受 浓度 (%)	最适生长 NaCl 浓度 (%)	KCl 最高耐受 浓度 (%)	最适生长 KCl 浓度 (%)
G-Q-14	7	0	10	0
80136	3	0	5	0
80137	3	0	0	0
80138	3	0	0	0
80147	3	0	7	0
80165	3	0	7	0
80166	10	0~5	20	0~7
80244	5	3	0	0
80250	5	3	0	0
80305	5	3	0	0
80038	15	5	20	5
80125	15	3	20	3
80129	15	3	15	5
80130	15	5	15	5
80133	15	5	20	5
80151	15	7	20	5
80169	15	5	15	5
80173	15	5	20	7
80174	15	5	20	3
80181	15	5	20	5
80182	15	7	20	5
80191	15	0	20	3
80199	15	5	20	5
80203	15	5	20	5
80245	10	5	20	5
80251	15	5	20	7
80254	15	3	20	3
80256	15	3	20	3
80263	15	5	20	5
ATCC35940 ^T	10	3	15	3

表 3 Na⁺ 依赖型菌株的补充实验结果

	pH8			pH9			pH10			pH11			pH12		
	1%	2%	3%	1%	2%	3%	1%	2%	3%	1%	2%	3%	1%	2%	3%
KOH															
80244	++	++	++	++	++	+	+	++	w	+	+	-	w	w	-
80250	+	++	++	++	++	+	++	++	+	w	w	+	-	-	-
80305	++	++	+	++	++	+	++	++	w	+	+	-	-	-	-
K ₂ CO ₃															
80244	++	++	++	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80250	++	++	++	+	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
80305	-	-	-	-	+	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-

注: w 表示菌株微弱生长, + 表示菌株生长量少, ++ 表示菌株生长量较多, - 表示菌株没有生长

进一步实验中 (见表 4), 菌株 G-Q-14、80136、80138、80147、80137、80165 在 pH11~12 不生长, 仅菌株 80038 在 pH10~12 可以生长, 80166 可在 KOH 调节的 (含

1% K₂CO₃) 的培养基 pH10 ~ 11 生长。CO₃²⁻ 对这一类型的菌株生长的影响随着 NaOH、KOH 的添加仅发生微弱的变化, CO₃²⁻ 对多数菌株生长的影响依然存在。

表 4 CO₃²⁻ 敏感菌株的补充实验结果

菌号	1% Na ₂ CO ₃			1% K ₂ CO ₃		
	pH10	pH11	pH12	pH10	pH11	pH12
G-Q-14	+	-	-	+	-	-
80038	++	++	+	++	+	-
80136	+	-	-	+	-	-
80137	+	-	-	+	-	-
80147	+	-	-	+	-	-
80165	-	-	-	+	-	-
80166	+	-	-	++	+	-

注: 表 4 所用符号意义同表 3

(3) 广谱型: 余下 19 株菌, 在 4 种碱性物质调节的 pH7 ~ 12 培养基上均可生长, 且 19 株菌均为 *Nocardiopsis* 属的。4 种碱性物质对这 19 株菌的生长无明显影响, Na⁺、K⁺ 对它们生长也无明显影响。

2.3 耐盐特性

依据不同盐浓度下 30 株菌的生长情况 (见表 2), 可将这些菌株分为 3 个类群: K⁺ 敏感型; 不耐盐型; 耐盐型。

(1) K⁺ 敏感型: 菌株 80244、80250、80305 在添加有 KCl 的用 NaOH 调节 pH 的培养基上不生长, 但在添加有 NaCl 的用 KOH、K₂CO₃ 调节 pH 的基础培养基上, 却可以生长。依据 Na⁺ 依赖嗜碱放线菌实验结果, 菌株 80244、80250、80305 生长最适 NaCl 浓度应为 2%。这表明 3 株对 Na⁺ 有一定的依赖性, 对 K⁺ 敏感, 特别是在高碱性 pH 下。

(2) 不耐盐型: 菌株 G-Q-14、80136、80138、80147、80137、80165 的最适生长 NaCl 或 KCl 浓度均为 0, 耐受 NaCl 浓度在 7% 以下, 耐受 KCl 浓度在 10% 以下。这 6 株菌都是嗜碱 *Streptomyces*, 对 NaCl 或 KCl 的耐受范围较小, 且 NaCl、KCl 可抑制它们的生长。由此可知 NaCl、KCl 抑制一些嗜碱 *Streptomyces* 的生长。

(3) 耐盐型: 其余 21 株菌, 除了 80166 耐受 10% NaCl、20% KCl, 80038 属于 *Streptomyces* 属, 另外 19 株菌均为 *Nocardiopsis* 属, 它们可耐受 15% NaCl, 耐受 KCl 则多高达 20%, 耐受 KCl 能力比耐受 NaCl 要强。

2.4 嗜碱放线菌的一些生理学特性

不同碱性物质对生长的影响划分的 3 个类型的菌株和耐盐特性中所划分的 3 个类型的菌株基本上是一致的。*Streptomyces* 菌株 80244、80250、80305 都是 Na⁺ 依赖型和 K⁺ 敏感型。CO₃²⁻ 敏感型和不耐盐型的菌株除了 80166 外都是 *Streptomyces*, 这表明部分嗜碱 *Streptomyces* 对 CO₃²⁻ 敏感, NaCl、KCl 抑制它们的生长。广谱型和耐盐型的菌株大多是 *Nocardiopsis* 属, 它们即可耐受不同碱性物质, 又可耐受较高浓度 NaCl、KCl, 这可能就是 *Nocardiopsis* 属菌株为什么在碱性环境中广泛分布的原因, 它是碱性环境中的主要物种之一, 在进化过程中积累了适应极端环境的遗传特性。

2.5 对嗜碱放线菌分离方法的探索

研究中发现的 Na⁺ 依赖型, CO₃²⁻ 敏感型, 广谱型嗜碱放线菌, 及 3 种耐盐型嗜碱放线菌, 对其分离有一定的启示。自然界的碱湖、盐碱湖等高碱性环境中, 阳离子含

量较大的除了 Na^+ 外, 还有 K^+ 。中国有丰富的碱湖资源, 仅中国内蒙古有 59 个碳酸盐型盐湖, 碳酸盐型盐湖具有 Na^+ , $(\text{K}^+) // \text{CO}_3^{2-}$, HCO_3^- , SO_4^{2-} , Cl^- 平衡体系^[8]。是否存在对 K^+ 有依赖性的嗜碱放线菌? 我们还发现一些嗜碱放线菌对 CO_3^{2-} 敏感, 对 CO_3^{2-} 具有专一性的嗜碱细菌已有报道。在自然界高碱性环境中是否也有对 CO_3^{2-} 专一性依赖的嗜碱放线菌呢? 当然, 这只能是推测, 有待于进一步验证。

不同碱性物质 KOH 、 K_2CO_3 、 NaOH 、 Na_2CO_3 对嗜碱放线菌的生长有影响, 同时嗜碱放线菌有不同的耐盐特性。当然, 这些嗜碱放线菌的生理学特性与采样地点的环境, 及所用的分离培养基有关。嗜碱放线菌和嗜碱细菌具有一些类似的生理学特性, 如 Na^+ 依赖性, 有些可以耐受高盐。但也有一些差异, 如对 CO_3^{2-} 敏感。我们只是初步研究了嗜碱放线菌的一些生理学特性, 具体机理, 如对 Na^+ 依赖性等, 还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Tajiho H, Sato T, Inui M, *et al.* Agric Biol Chem, 1988, 52 (2): 301 ~ 306.
- [2] Tajiho H, Sakamoto T, Miyamoto K, *et al.* Chem Pharm Bull (Tokyo), 1990, 38 (8): 2299 ~ 2300.
- [3] Bahm Y S, Park J M, Bai D H, *et al.* J Antibiot, 1998, 51 (10): 902 ~ 907.
- [4] Krulwich T A, Guffanti A A, Annu Rev Microbiol, 1989, 26: 663 ~ 677.
- [5] Mikami Y, Miyashita K, Arai T. J Gen Microbiol, 1982, 128 (8): 1709 ~ 1712.
- [6] 李文均, 张永光, 姜成林. 微生物学通报, 2003, 30 (1): 66 ~ 70.
- [7] Krulwich T A, Ito M, Guffanti A A. Biochimica et Biophysica Acta 2001, 1505: 158 ~ 168.
- [8] 郑喜玉, 张明刚, 董继和, 等著. 内蒙古盐湖. 北京: 科学出版社, 1992. 145.