

嗜盐放线菌生物学特性初步研究*

唐蜀昆 李文均 张永光 徐丽华 姜成林

(云南大学微生物所教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)

摘要:通过对从新疆、青海等地采集的盐碱土样中分离获得的43株嗜盐或耐盐放线菌以及4株典型菌株的NaCl耐受实验,对不同浓度的 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 的选择性实验及pH耐受实验进行了研究。发现耐盐放线菌对 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} 有广泛的适应性,只有少数耐盐放线菌能在较低浓度的 CaCl_2 条件下生长;嗜盐放线菌对 Na^+ 有广泛的适应性,多数嗜盐放线菌生长所需的 Na^+ 可被 K^+ , Mg^{2+} 所替代,而不能被 Ca^{2+} 所替代,少数嗜盐放线菌的生长离不开 Na^+ ,对 Na^+ 有高度的专一性,是专嗜 Na^+ 的嗜盐放线菌,说明不同嗜盐放线菌对 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 的适应有选择性。因此,提出自然环境中是否也存在类似的专嗜 K^+ 或专嗜 Mg^{2+} 的嗜盐放线菌的推测。无论是嗜盐还是耐盐放线菌其pH生长范围都在6.0~10之间,生长最适pH7.0~8.0。另外,嗜盐放线菌的分布与分离地点也有一定的相关性。

关键词: 极端环境, 嗜盐放线菌, 阳离子

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 04-0015-05

STUDIES ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HALOPHILIC ACTINOMYCETES

TANG Shu-Kun LI Wen-Jun ZHANG Yong-Guang 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: Studies on NaCl concentration, pH tolerance and selectivity to different concentrations of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} and Ca^{2+} of 43 isolates from the saline soils in XinJiang, HeBei and QingHai Provinces of China and 4 type strains were performed in this paper. Results showed that halotolerant actinomycetes have extensive adaptability to Na^+ , K^+ and Mg^{2+} and only a few of them can grow in low CaCl_2 concentration. Halophilic actinomycetes have extensive adaptability to Na^+ , and for most halophilic actinomycetes, Na^+ can be substituted by K^+ , Mg^{2+} , but not for Ca^{2+} . For some halophilic actinomycetes, it is necessary to have Na^+ for their growth. It also showed that the growth of all halophilic actinomycetes had selectivity with different concentration of Na^+ , K^+ , Mg^{2+} . So it is presumed that only Kaliumphilic or Magnesiumphilic Actinomycetes maybe exist in high salt environments. In addition, the growth pH range were 6.0~9.0 and the optimum pH were 7.0~8.0 not only for halophilic but also for halotolerant actinomycetes. The distribution of halophilic actinomycetes also have some relativity to isolation sites.

Key words: Extreme Environments, Halophilic Actinomycetes, Positive Ion

就整个极端环境微生物而言, 放线菌的研究远不如细菌。最重要的原因是放线菌生长慢, 分离困难。极端环境放线菌对营养的需求与普通环境下的放线菌不一样, 对嗜盐放线菌在适应高盐环境的机制上与细菌有何异同也不了解, 这极大的限制了我们对嗜盐放线菌新物种的发现以及对其资源的利用开发。深入研究嗜盐放线菌的生理学

* 国家科技部基础研究重大项目 (No. 2001CCC00600)

云南省自然科学基金项目 (No. 2001C0001Q)

云南省教育厅基金项目 (No. 01111134)

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: 2002-07-24, 修回日期: 2002-09-09

问题对全面正确认识嗜盐放线菌是必不可少的。

人们很早就认识到微生物可以在高浓度的盐环境中生长，但对嗜盐放线菌的研究的早期报道始于 1975 年，Gochnauer^[1]等在研究红皮盐杆菌的类脂过程中无意从被污染的平板中首次分离到一株嗜盐放线菌，后经分类研究将其定名为嗜盐多孢放线菌 (*Actinopolyspora halophila*)。此后，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，与嗜盐古菌相比，很少有关嗜盐放线菌生理学方面的研究报告。其抗高浓度 NaCl 的生理机制，对不同离子的选择性适应、pH、培养温度以及培养基的营养成分对嗜盐放线菌的生长、代谢产物及其细胞组份的影响至今也不太清楚。解决好这些问题，才能对今后嗜盐放线菌的分离和分类研究提供理论依据，才能更好的开发利用嗜盐放线菌资源。

对嗜盐放线菌类型的划分^[2-4]，主要也是依据嗜盐菌最适生长所需 NaCl 浓度的不同分别提出的不同划分方法。到目前为止，Kushner^[5]提出的划分方法（见表 1）仍为人们广泛接受。

但是，自然条件下的盐湖，盐碱地，海水等高盐环境中，NaCl 并非唯一的盐。仅以中国的新疆，内蒙古两地的 478 个大小盐湖为例^[6,7]，多数盐湖卤水中含量较高的阳离子顺序为 Na^+ ， K^+ ， Mg^{2+} ， Ca^{2+} 。因此，仅从 NaCl 的浓度范围去研究嗜盐放线菌，对认识嗜盐放线菌也是不够全面的。

本实验总共使用分别从新疆，青海，河北等地采集的盐碱地土样中分离获得的嗜盐或耐盐放线菌 43 株以及 *Prauserella rugosa* (DSM43194^T)，*Saccharomonospora halophila* (DSM 44411^T)，*Nocardiopsis kunsanensis* (KCTC9831^T)，*Nocardiopsis halotolerans* (DSM44410^T) 4 株嗜盐或耐盐放线菌典型种。对其 pH 耐受范围，NaCl 浓度耐受范围以及对 Na^+ ， K^+ ， Mg^{2+} ， Ca^{2+} 的选择适应性等生理学方面的问题进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 菌株

从新疆，青海，河北等地采集的盐碱地土样中分离获得的嗜盐或耐盐放线菌 43 株以及 *Prauserella rugosa* (DSM43194^T)，*Saccharomonospora halophila* (DSM44411^T)，*Nocardiopsis kunsanensis* (KCTC9831^T)，*Nocardiopsis halotolerans* (DSM44410^T) 4 株嗜盐或耐盐放线菌典型种。

1.2 培养基

1.2.1 pH 耐受范围：基础培养基为 ISP5 (1L)：天门冬酰胺 1g，甘油 10g， $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g，trace salt 1mL。采用液体试管培养，28℃，每隔 10d 观察记录 1 次，到 30d 后结束，重复 2~3 次。

Buffer: pH6.0: NaOH-KH₂PO₄; pH7.0: NaOH-KH₂PO₄; pH8.0: NaOH-KH₂PO₄;

pH9.0: 硼沙-硼酸, pH10.0: 硼沙-NaOH; pH11.0: Na_2HPO_4 -NaOH; pH12.0: KCl-NaOH; pH13.0: KCl-NaOH。

1.2.2 NaCl 耐受范围: 基础培养基为 ISP5 (1L): 天门冬酰胺 1g; 甘油 10g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g; trace salt 1mL; pH7.0~8.0。采用液体试管培养法于 28℃ 培养, 每隔 10d 观察记录 1 次, 到 30d 后结束, 重复 2~3 次。NaCl 浓度: 0%, 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%。

1.2.3 对 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 的选择性适应: 基础培养基为 ISP5 (1L): 天门冬酰胺 1g, 甘油 10g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1g, trace salt 1mL, agar 20, pH 7.0~8.0。培养基与盐分别灭菌后充分混匀, 倒平板。平板划线接种于 28℃ 培养, 每隔 10d 观察记录 1 次, 到 30d 后结束, 重复 2~3 次。NaCl 浓度: 0, 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%。KCl 浓度: 0, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%。 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度: 0, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%。 CaCl_2 浓度: 0, 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%。

2 结果与讨论

2.1 NaCl 耐受实验

见表 1。嗜盐放线菌在不同分离地点及不同属之间的分布存在一定的差异性。从青海, 新疆等地一共分离到 13 株嗜盐放线菌和 30 株耐盐放线菌。尽管采用相同的分离培养基, 从分离到的菌株数量及分布来看, 青海, 新疆, 河北的土样中分离到的菌株数量分别为 32 株, 8 株, 3 株, 以青海土样中分离到的菌株最多。从所分离出的菌株的种类组成来看, 主要分布在以下 5 个放线菌属中: 拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*), 链单孢菌属 (*Streptomonospora*), 普氏菌属 (*Prauserella*), 糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*), 其中大多数菌株为拟诺卡氏菌属, 36 株占 80% 左右; 而从嗜盐放线菌的数量及分布来看, 青海, 新疆, 河北的土样中分离到的菌株数量分别为 3 株, 7 株, 3 株, 从分离结果可看出, 新疆, 河北土样中分离到的放线菌菌株大多为嗜盐放线菌, 青海分离到的菌株数量虽然远远高于新疆, 河北, 但大多数为耐盐放线菌。从分离出的嗜盐放线菌的种类组成来看, 主要分布在 4 个放线菌属中: 拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*), 链单孢菌属 (*Streptomonospora*), 普氏菌属 (*Prauserella*) 和糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*)。分离到的链单孢菌属 (*Streptomonospora*) 和糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*) 的菌株数量虽少, 但都是嗜盐放线菌, 分离到的拟诺卡氏放线菌属 (*Nocardiopsis*) 的菌株数量虽然最多, 但大多数为耐盐放线菌, 嗜盐放线菌所占比例极低 (25%)。从 NaCl 浓度的耐受范围来看, 所分离到的菌株无论是嗜盐放线菌或是耐盐放线菌, 都能忍受 20% 的 NaCl 浓度, 但却不能在 25% 的 NaCl 浓度下生长。

2.2 pH 耐受实验

无论是嗜盐放线菌还是耐盐放线菌菌株的 pH 生长范围在 6.0~10.0 之间, 最适 pH 均为 7.0~8.0, 而不是起初设想的从盐碱地分离的菌株以嗜盐嗜碱的居多, 很难从盐碱地中分离到真正嗜盐碱的放线菌的现象值得进一步研究探讨。

2.3 嗜盐放线菌对 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 生长的耐受范围实验结果

见表 2。

表2 不同浓度的 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} 对嗜盐和耐盐放线菌生长的影响 (w/v%)

类型	菌株	属名	NaCl 浓度	KCl 浓度	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 浓度	CaCl_2 浓度
嗜盐放线菌	90001	<i>Prauserella</i>	3% ~ 20%	2% ~ 25%	5% ~ 25%	不生长
	90002	<i>Streptomonospora</i>	5% ~ 20%	不生长	20% (极差)	不生长
	90003	<i>Streptomonospora</i>	1% ~ 20%	5% ~ 20%	不生长	不生长
	90004	<i>Nocardiopsis</i>	3% ~ 20%	5% ~ 25%	5% ~ 20%	不生长
	90006	<i>Nocardiopsis</i>	3% ~ 20%	2% ~ 25%	5% ~ 25%	不生长
	90007	<i>Saccharomonospora</i>	5% ~ 20%	不生长	不生长	不生长
	90008	<i>Nocardiopsis</i>	1% ~ 20%	2% ~ 25%	5% ~ 15%	不生长
	90009	<i>Nocardiopsis</i>	3% ~ 20%	2% ~ 25%	5% ~ 20%	不生长
	90010	<i>Nocardiopsis</i>	3% ~ 20%	2% ~ 25%	5% ~ 20%	不生长
	90011	<i>Nocardiopsis</i>	3% ~ 20%	2% ~ 25%	5% ~ 20%	不生长
	90014	<i>Nocardiopsis</i>	1% ~ 20%	2% ~ 25%	5% ~ 20%	不生长
	90015	<i>Nocardiopsis</i>	3% ~ 20%	5% ~ 25%	15% ~ 20%	不生长
	90016	<i>Nocardiopsis</i>	3% ~ 20%	5% ~ 25%	15% ~ 25%	不生长
	KCTC9831 ^T	<i>Nocardiopsis</i>	5% ~ 20%	5% ~ 20%	不生长	不生长
	DSM44411 ^T	<i>Saccharomonospora</i>	5% ~ 20%	不生长	20% ~ 25%	不生长
耐盐放线菌	90005	<i>Prauserella</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	0 ~ 15%
	90012	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 15%	0 ~ 25%	0 ~ 1%
	90013	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 20%	不生长
	90017	<i>Streptomyces</i>	0 ~ 15%	0 ~ 5%	0 ~ 20%	0 ~ 1%
	90018	<i>Streptomyces</i>	0 ~ 15%	0 ~ 5%	0 ~ 25%	0 ~ 1%
	90021	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90022	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90023	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	不生长
	90024	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90025	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	不生长
	90026	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	不生长
	90027	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	不生长
	90028	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	不生长
	90029	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	不生长
	90030	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90031	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	不生长
	90032	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	不生长
	90033	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90034	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90035	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90036	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 20%	不生长
	90037	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90038	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90039	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90040	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 20%	不生长
	90041	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 25%	不生长
	90042	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 20%	0 ~ 20%	不生长
	90043	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 20%	不生长
	90044	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	不生长
	90045	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 20%	不生长
	DSM44410 ^T	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	不生长
	DSM43194 ^T	<i>Prauserella</i>	0 ~ 20%	0 ~ 25%	0 ~ 25%	0 ~ 10%

2.3.1 耐盐放线菌表现出广泛的对 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} 的耐受现象：所有 34 株耐盐放线菌都能在一定浓度的 NaCl, KCl 和 MgCl_2 条件下生长。其中只有 *Streptomyces* 属的 90017 和 90018 表现出对 NaCl, KCl, MgCl_2 的耐受范围差异较大，可在较高浓度的 NaCl, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0 ~ 15%, 0 ~ 20%) 生长，而 KCl 的生长范围却不超过 5%。 CaCl_2 只对 90005, 90012, 90017, 90018 和 *Prauserella rugosa* (DSM43194^T) 等少数耐盐放线菌的生长有影

响，其中只有 90005 和 *Prauserella rugosa* (DSM43194^T) 能在 10% 的 CaCl₂ 浓度下生长。

2.3.2 嗜盐放线菌对 Na⁺, K⁺, Mg²⁺ 的选择性适应：对于多数嗜盐放线菌 (10/15)，生长所需的 Na⁺ 完全可以被一定浓度的 K⁺ 和 Mg²⁺ 所替代。但也有少数嗜盐放线菌例外，如 90003 和 *Nocardiopsis kunsanensis* (KCTC9831^T) 均能在一定浓度的 Na⁺, K⁺ 下生长，却不能在只有 MgCl₂·6H₂O 的条件下生长；90002 和 *Saccharomonospora halophila* (DSM44411^T) 只可在高浓度的 MgCl₂·6H₂O (20%) 和一定浓度的 NaCl (5% ~ 20%) 条件下生长，而在只有 KCl 的基础培养基上却不能生长；90007 则完全只能在有 Na⁺ 的培养基上才能生长，K⁺, Mg²⁺ 无法替代其生长所需的 Na⁺，是专性嗜 Na⁺ 的嗜盐放线菌。Ca²⁺ 对所有嗜盐放线菌实验菌株的生长均无任何作用。

2.3.3 不同分离地点的嗜盐放线菌对 Na⁺, K⁺, Mg²⁺ 的适应有差异：河北，青海土样中分离到的嗜盐放线菌均能在一定浓度的 NaCl, KCl, MgCl₂·6H₂O 条件下生长。而分离自新疆土样的 7 株嗜盐放线菌中，4 株可在一定浓度的 NaCl, KCl, MgCl₂·6H₂O 条件下生长，其余 3 株：90002 不能在只有 KCl 的基础培养基上生长，90003 不能在只有 MgCl₂·6H₂O 的基础培养基上生长，90007 只能在有 Na⁺ 的条件下才能生长。这表明分离自新疆的嗜盐放线菌对 Na⁺, K⁺, Mg²⁺ 的适应有选择性。其土样离子成分的组成和嗜盐放线菌类型的相互关系值得进一步研究。

2.3.4 嗜盐放线菌的

离子类型划分新设想：

从分离自新疆的嗜盐放线菌对 Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺ 的选择性适应的现象，可以看出嗜盐放线菌和各种不同离子之间的关系

是十分复杂的。长期以来对以 NaCl 的最适生长范围来划分嗜盐放线菌类别的标准，限制了我们对嗜盐放线菌的全面认识。自然环境中不仅存在大量的广泛适应 Na⁺, K⁺, Mg²⁺ 的广义嗜盐放线菌以及专嗜 Na⁺ 的嗜盐放线菌 (90007)，考虑到分离这些菌株使用的盐是 NaCl，我们推测是否也存在有不为人所知的专嗜 K⁺ 和专嗜 Mg²⁺ 等的嗜盐放线菌呢？（见表 3）当然这需要证实。果真如此，这就意味着自然环境尚有许多嗜盐放线菌不为人所认识。

表 3 嗜盐放线菌的离子类型划分新设想

	放线菌类型	生长所需的离子
从分离自新疆的嗜盐放线菌对 Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ 的选择性适应的现象，可以看出嗜盐放线菌和各种不同离子之间的关系	广义嗜盐放线菌	生长所需的 Na ⁺ 可被 K ⁺ 或 Mg ²⁺ 替代
	嗜盐放线菌	嗜 Na ⁺ 型放线菌 无 Na ⁺ 不生长或生长极差
		嗜 K ⁺ 型放线菌 无 K ⁺ 不生长或生长极差
		嗜 Mg ²⁺ 型放线菌 无 Mg ²⁺ 不生长或生长极差
	耐盐放线菌	耐受范围 0.2 ~ 2.5 mol/L (1.17 ~ 30.4% NaCl)
	非盐放线菌	小于 0.2 mol/L (1.17% NaCl) 生长良好

参 考 文 献

- [1] Sykes G, Skinner F A. Mammalian Practical Importance, New York: Academic press, 1973, 1 ~ 10.
- [2] Vreeland R H. Microbiol, 1987, 14: 311 ~ 356.
- [3] Larsen P, Sydne L K, Landfald B, et al. Arch Microbiol, 1987, 147 (10): 1 ~ 7.
- [4] Da Costa M S, Duarte J C, Williams R A D. Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology. London and New York: 1989, 289 ~ 309.
- [5] Kushner D J. Microbial life in extreme environments, London: Academic Press, 1978, 317 ~ 368.
- [6] 郑喜玉, 李秉孝, 高章洪, 等著. 新疆盐湖. 北京: 科学出版社, 1995.26 ~ 32.
- [7] 郑喜玉, 张明刚, 董继和, 等著. 内蒙古盐湖. 北京: 科学出版社, 1992.42.