

三江源地区不同退化程度草地的土壤放线菌区系

马 腾^{1,3} 王雪薇² 阮继生¹ 刘 宁¹ 黄 英^{1*}

(1. 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101)

(2. 中国科学院微生物研究所 真菌地衣系统学实验室 北京 100101)

(3. 首都师范大学生命科学学院 北京 100037)

摘 要: 用不同分离方法, 对三江源地区不同退化程度草地土壤放线菌的数量和多样性进行了比较。从 5 份土样中共分离放线菌 178 株, 根据表型特征和 16S rRNA 基因序列分析, 分别归入 7 个已知属: 小单孢菌属(*Micromonospora*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、游动放线菌属(*Actinoplanes*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。其中链霉菌属分离菌株可归入 7 个表型类群。发现轻度退化高寒草原的土壤放线菌数量、丰度和多样性高于重度退化高寒草原; 针茅高寒草原的土壤放线菌数量和多样性高于蒿草高寒草甸, 而其中链霉菌的种类低于后者。表明高寒草地的退化程度与其中土壤放线菌的数量和多样性呈负相关。

关键词: 三江源地区, 退化高寒草地, 放线菌区系, 土壤

Actinomycete Flora in Soil of Differently Degraded Alpine Grasslands in Three River Source Area

MA Teng^{1,3} WANG Xue-Wei² RUAN Ji-Sheng¹ LIU Ning¹ HUANG Ying^{1*}

(1. State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

(2. Key Laboratory of Systematic Mycology & Lichenology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

(3. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037)

Abstract: The quantity and diversity of soil actinomycetes were compared between grasslands with different degradation degree in Three River Source area, using different isolation methods and media. In this area, 178 strains were isolated from 5 soil samples collected, and were classified into 7 recognized genera based on phenotypic characteristics and 16S rRNA gene sequences, including *Micromonospora*, *Promicromonospora*, *Nocardia*, *Pseudonocardia*, *Actinoplanes*, *Kribbella* and *Streptomyces*. Isolates of *Streptomyces* were further divided into 7 phenotypic groups. Larger quantity and higher diversity of actinomycetes were found in soil from lightly degraded steppe than in soil from heavily degraded steppe, and were also found in soil from *Stipa purpurea* alpine steppe than in soil from *Kobresia pygmaea* alpine meadow which, however, possessed higher diversity of streptomyces than the former. The results indicate a negative correlation between degradation degree of alpine grasslands and quantity and diversity of the soil actinomycetes.

Keywords: Three River Source area, Degraded alpine grasslands, Actinomycete flora, Soil

被誉为“中华水塔”的三江源位于青藏高原腹地青海省南部,是长江、黄河和澜沧江的发源地,草地资源丰富,是发展高原草地畜牧业的物质基础。但近几十年由于人口增长,进而进行掠夺性农牧业经营,加之全球气候变化等的影响,使三江源地区草场退化、土地荒漠化日趋严重,生态环境不断恶化,并将严重威胁长江、黄河中下游地区的生态安全^[1]。因此,认识、保护和修复该地区生态系统已成为高原生态与区域可持续发展的重要课题。

放线菌是产生抗生素、酶制剂和免疫调节剂等多种生物活性物质的重要微生物资源,也是广泛分布于土壤中的优势微生物类群,其种类繁多,代谢功能各异,对土壤有机物的矿化、土壤肥力,和自然界物质循环有着重要作用^[2,3]。有报道显示,从青海高寒草甸土壤中分离所得的一些链霉菌不仅具有多种酶活性,而且对真菌和细菌有拮抗活性^[4];高海拔地区土壤中放线菌的数量与生态环境条件有着极为密切的关系,植被情况、土壤冻结时间、冻结期、海拔高度和年均温度等均是其影响因素^[5]。

本文通过研究三江源地区不同退化程度草地的土壤放线菌的数量和种类,以期为这一极端环境中的微生物资源研究提供材料,同时为高寒草地生态系统的保护和修复提供线索。

1 材料与方法

1.1 土壤样品来源

2005年8月上旬分别在青海省果洛藏族自治州玛多县鄂陵湖北岸的高寒草原紫花针茅草地选择轻

度退化和重度退化各2个样地;在青海省玉树州称多县珍秦乡的高寒草甸选择了1个轻度退化的小嵩草草地型样地。详情见表1。每个样地随机选取6个样方,分别用取土钻取5点的0~30 cm表层土壤,混合为1份,室温风干、研碎、4℃保存。

1.2 分离方法和分离培养基

土样分别经分散差速离心(DDC)^[6]预处理和常规悬浮振荡预处理,稀释到10⁻³、10⁻⁴,平板涂布法进行分离。培养基采用腐殖酸琼脂(HVA)^[7]、稀释的营养琼脂(DNB agar)^[8]、燕麦粉琼脂(ISP3)、葡萄糖-天门冬素琼脂和土壤浸汁琼脂共5种培养基,加入放线菌酮、制霉菌素、萘啶酮酸各50 μg/mL以抑制真菌和细菌生长。28℃下培养28 d后统计平板菌落数,挑取放线菌至ISP2培养基纯化,-20℃甘油保藏。

1.3 形态和培养特征观察

将纯化的放线菌接种ISP2平板,28℃插片培养。分别在培养7 d、14 d和21 d后取下插片制作永久装片,用光学显微镜观察形态特征,肉眼观察平板培养特征,记录气丝、基丝和色素颜色^[9,10]。

1.4 细胞壁氨基酸组分分析

使用薄板层析法分析细胞壁赖氨酸及3种二氨基庚二酸(DAP)异构体成分^[10]。

1.5 总DNA的提取和16S rRNA基因的PCR扩增

参照Rainey等^[11]的方法小量提取总DNA和PCR扩增16S rRNA基因,扩增引物为通用引物27f和1492r。

表 1 采样地自然状况
Table 1 General situation of the sample sites

土样编号 Sample No.	采样地点 Location	海拔(米) Altitude (m)	草地类 Grassland class	草地型 Grassland type	退化程度 Degradation degree
I	青海省果洛州鄂陵湖畔	4275	Alpine steppe	<i>Stipa purpurea</i>	Light
II	青海省果洛州鄂陵湖畔	4275	Alpine steppe	<i>Stipa purpurea</i>	Heavy ^a
III	青海省果洛州鄂陵湖畔	4310	Alpine steppe	<i>Stipa purpurea</i>	Light
IV	青海省果洛州鄂陵湖畔	4290	Alpine steppe	<i>Stipa purpurea</i>	Heavy ^b
V	青海省玉树州称多县	4255	Alpine meadow	<i>Kobresia pygmaea</i>	Light

注: ^a: 退化后优势植物为二裂萎陵菜、阿尔泰狗娃花、西伯利亚蓼等; ^b: 退化后优势植物为西藏微孔草、披针叶黄华、西伯利亚蓼等
Note: ^a: The dominant plant species after degradation are *Potentilla centigrana*, *Heteropappus altaicus*, *Polygonum sibiricum*, etc; ^b: The dominant plant species after degradation are *Microula tibetica*, *Thermopsis lanceolata*, *Polygonum sibiricum*, etc

1.6 16S rRNA 基因测序及序列分析

测序由北京诺赛基因公司完成。测序结果通过 NCBI 的 Blastn 程序与 GenBank 数据库中的已知序列进行比对, 确定分离菌株的分类地位。

1.7 抗菌菌和抗真菌活性测试

采用琼脂移法^[12]进行。抗菌活性测试菌株: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、尖孢镰刀霉(*Fusarium oxysporum*)和绿色木霉(*Trichoderma viride*), 来自中

国普通微生物保藏中心(CGMCC)。

2 结果

2.1 土壤样品的放线菌丰度及抗菌活性

各样地放线菌的总体丰度结果见表 2。Ⅰ、Ⅱ号样地的土壤放线菌数量最高, 为 $18.13\sim19.88\times 10^4$ (CFU/g dry wt), Ⅲ号样地次之, Ⅳ号样地的放线菌数量最低。就土壤放线菌比例而言, Ⅰ、Ⅱ号样地最高, Ⅲ号样地次之, Ⅳ号样地最低。

表 2 各土壤样品放线菌的丰度和抗菌活性 Table 2 Abundance and anti-microbial activity of actinomycetes in each sample				
样品 Sample No.	放线菌菌落形成单位 Actinomycete CFU (CFU $\times 10^4$ /g dry wt)	平板放线菌菌落比例 Proportion of actinomycete colonies on the isolation plates (%)	抗菌菌分离菌株比例 Proportion of anti-bacteria isolates (%)	抗真菌分离菌株比例 Proportion of anti-fungi isolates (%)
I	19.88	80.7	47.4 (9/19)	21.2 (4/19)
II	6.68	20.0	20.0 (2/10)	0 (0/10)
III	18.13	21.2	34.0 (18/53)	22.6 (12/53)
IV	16.50	13.9	40.7 (11/27)	7.4 (2/27)
V	10.40	67.0	36.2 (25/69)	11.6 (8/69)

分别针对各土样, 挑取、纯化形态特征具有一定代表性的菌落, 共获得分离菌株 178 株。其中 36.5%的菌株表现出不同程度的抗细菌活性, 14.6%的菌株对真菌有抑制作用。各土样分离菌株的抗菌活性比例亦见表 2, 其中 Ⅰ号样地的抗菌活性分离菌株比例明显低于其他样地。

2.2 分离菌株的形态与细胞壁化学分析

通过培养特征和显微形态特征初步区分链霉菌和稀有放线菌。细胞壁氨基酸组分分析表明, 所有分离菌株有 3 种不同的细胞壁氨基酸组成: 1) 主要含 L,L-DAP, 136 株; 2) 主要含 meso-DAP, 35 株; 3) 不含 DPA 而含有赖氨酸, 7 株。结合形态特征和细胞壁氨基酸组成, 初步确定 1) 主要为链霉菌, 另有 3 株菌的基丝和气丝均可断裂成不规则的杆状体, 应为稀有放线菌; 2) 为稀有放线菌, 其中 3 株菌无气生菌丝, 基内菌丝生有不规则形状的孢囊, 遇水破裂, 释放出可运动的孢子, 应为游动放线菌; 3) 为原小单孢菌, 7 株菌的分枝状菌丝均断裂成杆球体。

2.3 代表菌株的 16S rRNA 基因序列分析

根据形态和细胞壁氨基酸组分分析结果, 将

178 株分离菌株进行分群, 从中挑选出 23 株代表菌株进行 16S rRNA 基因测序和序列比对分析。除代表游动放线菌的 1 株菌测序失败外, 其它 22 株菌均获得良好测序结果, 其中 8 株属于链霉菌属 (*Streptomyces*), 其余 14 株分别属于小单孢菌属 (*Micromonospora*)、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、和韩国生工菌属 (*Kribbella*)。所测序列的 GenBank 注册号为 EU677770~EU677782, EU677784~EU677792。

2.4 土壤样品放线菌的区系分布

在所有样地土壤放线菌分离菌株中, 链霉菌共 133 株, 为总数的 74.7%, 占绝对优势。稀有放线菌以小单孢菌、原小单孢菌和诺卡氏菌属为主, 假诺卡氏菌、游动放线菌和韩国生工菌属的菌株仅占总数的 4.0%。另有 5.6%的菌株初次纯化后便难以生长, 未能获得 DNA 进行测序分析, 仅根据形态和细胞壁特征尚不能将其未归到任何已知属, 可能代表新的难培养放线菌类群(表 3)。

Ⅰ号样地的放线菌种类丰富, 其多样性是所有样地中最高的, 分布于 7 个已知属, 其中有其它样

表 3 各土壤样品的放线菌区系
Table 3 Actinomycete populations in each soil sample

属名 Genus	各土样菌株数 Number of isolates in each sample					菌株数合计 Total	占总菌株数比例 Proportion of total isolates (%)
	I	II	III	IV	V		
链霉菌 <i>Streptomyces</i>	11	6	29	23	64	133	74.7
小单孢菌 <i>Micromonospora</i>	3	1	8	2	3	17	9.6
原小单孢菌 <i>Promicromonospora</i>	3	2	1	1		7	3.9
诺卡氏菌 <i>Nocardia</i>		1	3			4	2.2
假诺卡氏菌 <i>Pseudonocardia</i>			1			1	0.6
游动放线菌 <i>Actinoplanes</i>			3			3	1.7
韩国生工菌属 <i>Kribbella</i>	1		2			3	1.7
未知属 <i>Unknown genus</i>	1		6	1	2	10	5.6
总属数 <i>Sum of genera</i>	5	4	8	4	3		

地所没有的假诺卡氏菌属和游动放线菌属, 另有 6 株难培养菌归于未知属。V 号样地只分离到 2 个已知属的放线菌, 另有 2 株难培养菌归于未知属, 在所有样地中其稀有放线菌的比例最低, 而链霉菌数量众多。

2.4 链霉菌的类群分布
根据表型特征, 将来源于 5 个样地的链霉菌进行归类分群, 共归为 7 个类群(表 4)。其中灰褐类群、烬灰类群和黄色类群占明显优势, 其他类群的比例较低, 只在部分样地中分离到。

表 4 各土壤样品的链霉菌类群分布
Table 4 Streptomyces groups distributed in each soil sample

类群名 Group name	各土样菌株数 Number of isolates from each sample					菌株数合计 Total	占总菌株数比例 Proportion of total isolates (%)
	I	II	III	IV	V		
灰褐类群 <i>Greyish brown</i>	1		16	7	19	43	32.33
烬灰类群 <i>Cinerosus</i>	4	5		6	13	28	21.05
黄色类群 <i>Yellow</i>	5	1	6	2	10	24	18.05
粉红孢类群 <i>Pink-sporus</i>	1				13	13	9.77
淡紫灰类群 <i>Light purplish grey</i>			3	2	5	10	7.52
金色类群 <i>Golden</i>			4	1	2	8	6.02
球孢类群 <i>Global-sporus</i>				5	2	7	5.26
总类群数 <i>Sum of groups</i>	4	2	4	6	7		

3 讨论

草地退化状况和草地类型是影响其中土壤放线菌区系的重要因素。从上述结果可以看出, 轻度退化高寒草原(样地 、)的土壤放线菌数量和多样性均高于重度退化的高寒草原(样地 、), 并且其中抗真菌活性菌株的比例明显较高。说明退化程度

轻的草地土壤营养状况较好, 其中放线菌数量多, 并且与物种多样性和生物活性成正相关, 与文献报道^[1,13]的总体微生物的状况相符。从草地类型来看, 以紫花针茅为建群种的高寒草原的土壤放线菌数量和多样性均普遍高于以小蒿草为建群种的高寒草甸(样地), 而前者所含链霉菌的类群多样性却低于后者。链霉菌的类群多样性与高寒草原的退化程度

则没有这样的相关性。在我们初次研究的所有样地中, 样地土壤放线菌的数量、多样性和活性都是最差的, 这也和其退化最为严重的状况相符。

此外, 不同地域来源的土壤质地也是影响其土壤放线菌区的可能因素。洛州玛多县的鄂陵湖畔位于巴颜喀拉山东北部, 具有典型的高原大陆性气候, 是较典型的高山丘陵地貌, 土壤质地为砂质壤土, 质地粗, 砂性强, 所含的放线菌数量和种类都较丰富; 玉树州称多县珍秦乡位于东昆仑褶皱带的南部, 高寒冷湿, 为高山地貌类型, 土壤质地为粉壤土, 表层土壤中根系盘结交错, 坚韧而有弹性, 所含的放线菌较少, 以菌丝发达的链霉菌为主。

我们对三江源地区不同草地的土壤放线菌区系的初步研究表明: 1)该地区存在着丰富多样的土壤放线菌资源; 2)就土壤放线菌的数量和多样性而言, 轻度退化高寒草原明显高于重度退化草原, 针茅高寒草原高于蒿草高寒草甸; 3)蒿草高寒草甸土壤中链霉菌的种类高于针茅高寒草原。可见, 土壤放线菌的数量和群落多样性与三江源地区草地的退化程度呈负相关; 保持、恢复土壤放线菌的数量和群落多样性, 对该地区生态系统的保护和修复, 以及生物资源的可持续利用具有积极意义。

致 谢: 感谢青海大学王永杰教授、李希来教授和周青平教授在样品采集方面提供的帮助。

参 考 文 献

- [1] 尚占环, 丁玲玲, 龙瑞军, 等. 江河源区退化高寒草地土壤微生物与地上植被及土壤环境的关系. 草业学报, 2007, 16(1): 34-40.
- [2] Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*, 2005,

58: 1-26.

- [3] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术. 北京: 科学出版社, 2004.
- [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] 薛泉宏, 谭志远, 朱铭莪, 等. 西藏土壤放线菌初步研究. 西北农业大学学报, 1999, 27(1): 28-32.
- [6] 王黎明, 黄 英, 崔庆锋, 等. 应用分散和差速离心法分离嗜酸和耐酸链霉菌的试验及评价. 微生物学通报, 2003, 30(6): 104-106.
- [7] Hayakawa MT, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new method for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Bioeng*, 1987, 65: 501-509.
- [8] Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, *et al.* Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 2391-2396.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Rainey FA, Ward-Rainey N, Kroppenstedt RM, *et al.* The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsiaceae* fam. nov.. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, 46: 28-96.
- [12] 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.
- [13] 高旭升, 田种存, 郝学宁, 等. 三江源区高寒草原草地不同退化程度土壤养分变化. 青海大学学报(自然科学版), 2006, 24(5): 37-40.