

8 株草本科植物根际土放线菌代谢产物活性初步研究

车敏娜, 吴 恒, 热孜万古力·赛买提, 王国威, 郑峻峻, 王胜宝, 陈士恩*

西北民族大学生命科学与工程学院, 兰州 730124

摘要: 为了探讨温度对西北民族大学榆中校区 8 株草本科植物根际放线菌出菌率的影响以及对放线菌代谢产物活性的影响进行初步研究, 为后续放线菌筛选以及培养最适温度方面提供基础资料。试验采用含有 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重铬酸钾和 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素的甘油精氨酸琼脂培养基, 对菌种进行 23、60、80、100 及 120 $^{\circ}\text{C}$ 五个不同温度的预处理, 利用稀释平板涂布法对 8 种草本科植物根系土壤样品进行分离, 初步探讨温度对放线菌数量和种类的影响; 利用 7 种筛选培养基对所得菌株定性检测, 进一步探讨功能酶产生菌的生理生化特性。结果表明: 通过 23、60、80、100 及 120 $^{\circ}\text{C}$ 五种不同温度试验, 同一土样在不同温度预处理下放线菌的数量和种类差异显著; 发现 18 株放线菌中有 9 株放线菌产淀粉酶, 16 株产蛋白酶, 16 株产脲酶, 18 株产过氧化氢酶, 12 株产聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯酶, 14 株产聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酯酶, 7 株产聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯酶, 5 株产色氨酸酶, 5 株产纤维素酶; 不同温度筛选的放线菌产酶种类不尽相同。说明西北民族大学榆中校区草本科植物根际放线菌产酶特性良好, 是淀粉酶、蛋白酶、酯酶等酶的重要来源; 随着预处理温度升高, 放线菌数量均随着温度升高呈降低趋势; 同一土样在不同温度下放线菌的种类与温度没有相关性, 但是特定的温度会筛选特定的菌株, 即某些菌对温度有一定的选择性。

关键词: 草本科植物; 根际土; 放线菌; 代谢产物

中图分类号: Q93-335

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.11.018

Preliminary Study on the Activities of Metabolites of Rhizosphere Soil Actinomycetes from Eight Herbaceae Plants

CHE Min-na, WU Heng, RE Ziwanguli · Saimaiti,

WANG Guo-wei, ZHENG Leng-jun, WANG Sheng-bao, CHEN Shi-en*

College of Life Science and Engineering, Northwest Minzu University, Lanzhou 730124, China

Abstract: The aim of this study was to investigate the effects of temperature on the rate of rhizosphere actinomycetes and the activity of actinomycetes in eight Chinese herbal medicine plants in Yuzhong campus of Northwest Minzu University, and to provide a preliminary study on the follow-up actinomycete screening. The glycerol arginine agar medium containing 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ potassium dichromate and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ penicillin was used to pretreat the five different temperatures of 23, 60, 80, 100 and 120 $^{\circ}\text{C}$. The effects of temperature on the number and species of actinomycetes were studied by plate coating method. The results showed that the effects of temperature on the number and species of actinomycetes were qualitatively detected by seven kinds of screening medium, and the physiology of functional enzyme producing bacteria was further explored by biochemical testing. The results showed that there were 9 strains of actinomycetes in 18 strains of actinomycetes, and the number and species of actinomycetes were different in different soils at different temperatures by 23, 60, 80, 100 and 120 $^{\circ}\text{C}$. Amylase production, 16 strains of protease, 16 strains of urease, 18 strains of catalase, 12 strains of polyoxyethylene sorbitan monolaurate, 14 strains of polyoxyethylene sorbitan fatty acid Esterase, 7 strains of polyoxyethylene sorbitan monooleate, 5 strains of tryptophanase and 5 cellulases. The different types of actinomycetes were different. The results showed that the activities of amylase, protease and esterase were an important source of enzyme, and the number of actinomycetes increased with the increasing of pretreatment temperature. The species of actinomycetes at different temperatures had no correlation with temperature, but the specific temperature will be used to screen

specific bacteria, that is, some bacteria have a certain selectivity to temperature.

Key words: Herbaceae plants; Rhyme soil; actinomycetes; metabolite

收稿日期: 2017-09-01 接受日期: 2017-09-20

基金项目: 因家民委专项综合改革试点(10019141); 国家科技支撑计划(2015BAD29B05); 西北民族大学中央专项资金资助研究生科研创新项目(Yxm2017121)

* 通信作者 E-mail: chshien@163.com

放线菌是一类与人类关系极为密切的微生物资源,许多生物活性物质诸如抗生素、酶制剂、氨基酸、维生素等均由放线菌产生。目前从微生物中发现的8000多种微生物活性物质中,有近70%是放线菌产生的^[1]。但是,人们分离到的放线菌仅占土壤中所有放线菌的10%左右^[2],有关分离方法,国内已有大量文献报道,但都存在着抑制剂以及特异放线菌的选择性分离问题,因此,寻求一种既能抑制细菌、真菌生长、又不影响放线菌生长的分离方法是筛选放线菌的关键^[3]。

植物根际是指生物和物理特性受到植物根系影响的紧密环绕根部的区域。在植物根际区域内生长的微生物称为根际微生物。植物根际是一个特殊的生态系统,在根际这个土壤微域中,根际微生物可以通过根际信息交流如产生生长素、赤霉素或激动素类物质影响植物生长^[4],那么其间生长的放线菌也必然有其特殊性。据报道,根际区域微生物要比非根际区域微生物多19~32倍,根际放线菌产生抗菌物质和其他生理活性物质的比例也显著高于根际周围土壤来源的放线菌^[5]。并且,从根际微生物的代谢产物中寻找各种生物活性物质是改善工业生产条件的又一重要途径。因此,植物根际微生物是一类值得深入研究与开发的微生物资源。

温度是影响放线菌生长的关键因素之一,大多数放线菌的最适生长温度为23~37℃,高温放线菌的生长温度范围在50~65℃,也有许多菌种在20~23℃以下仍生长良好。对土样做预处理目的在于减少细菌和真菌污染,增加放线菌出菌率。有研究证明,将风干土壤样品在100℃或120℃处理60 min,可以有效分离 *Streptosporangium*、*Microbispora*、*Microtetraspora*、*Actinomadura*、*Micronospora*、*Actinoplanes* 等稀有放线菌。宋现芹等研究表明60~65℃处理120 min能有效分离 *Micromonospora*^[6]。但以温度为主要变量对放线菌出菌率的研究未见报道。

蛋白酶、淀粉酶、酯酶等一些功能酶在生命科学领域、食品行业、饲料添加剂、医学科学及化工工业等行业具有潜在的应用价值^[7]。工业生产一般是在特殊的物理化学条件下进行的,因而,这个过程中起重要作用的酶制剂需要合适的反应条件才能达到最佳酶活,然而通常情况下这种最佳反应条件很难达到^[8]。因此,寻找能够适应特殊环境条件的酶制剂是关键。放线菌是一类能够产生多种生物活性物质的微生物资源,如酶、抗生素、氨基酸、维生素、有

机酸、生物碱等均由其产生。

西北民族大学榆中校区位于甘肃省中部、省会兰州东郊的榆中县,榆中县地处 E 103°49'15" ~ N 35°34'20", N 35°34'20" ~ N 36°26'30"之间。榆中县内地层发育不全,缺失整个古生界和中生界的三叠系,县境内的侵入岩为前古生代和早古生代晚期的酸性岩浆岩,总之,其地质构造极其复杂。目前,还没有针对我国西北民族大学榆中校区草本科植物根际放线菌资源的相关研究报道。本文采用了稀有放线菌资源选择性分离方法,对采自西北民族大学榆中校区不同海拔梯度、不同植被类型的不同草本科植物根系土壤放线菌进行分离,对其做了不同温度的预处理,探讨了温度对放线菌数量和种类的影响,并对所得菌株做了部分生理活性测定,对功能酶产生菌做了筛选。

1 实验材料

1.1 土壤样品

样品采自西北民族大学榆中校区以及周边不同海拔不同经纬度的草本科植物根际土。

1.2 试剂

10%过氧化氢溶液,30%尿素,无水乙醚,聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯酶(底物吐温-20)、聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯酶(吐温-40)和聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯酶(吐温-80),1%胰胨水溶液,对二甲氨基苯甲醛,乙醇(75、95、100%),浓HCl;甲基红试剂:甲基红0.1 g,95%乙醇300 mL,蒸馏水200 mL;碘液:碘片1 g,碘化钾2 g,蒸馏水300 mL;抑菌剂:放线菌酮40 μg/mL,重铬酸钾75 μg/mL,青霉素2 μg/mL。

1.3 培养基

1.3.1 放线菌分离培养基(甘油精氨酸琼脂):精氨酸2.0 g;NaCl 50 g;甘油12.5 g;FeSO₄·7H₂O 0.01 g;MgSO₄·7H₂O 0.5 g;K₂HPO₄ 1 g;CuSO₄·5H₂O 0.0001 g;ZnSO₄·7H₂O 0.0001 g;MnSO₄·H₂O 0.0001 g,蒸馏水1000 mL;琼脂20 g。

1.3.2 生理生化所用培养基

MR实验培养基:蛋白胨5 g,葡萄糖5 g, K₂HPO₄ 5 g,蒸馏水1000 mL。

硫化氢产生培养基[柴斯纳(Tresner)培养基]:配方为蛋白胨10 g,柠檬酸铁0.5 g,蒸馏水1000 mL,pH 7.2。

1.3.3 功能酶筛选培养基:参照文献阮继生、黄

英^[9]进行,主要进行了蛋白酶、淀粉酶、脲酶、过氧化氢酶、聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯酶、聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯酶、产聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯酶、色氨酸酶、纤维素酶的筛选。

2 实验方法

2.1 土样采集

2016年7月下旬从西北民族大学榆中校区以

及周边选取了8种不同植被类型、不同海拔梯度(海拔1821~1962 m)的样区,采集到8份具有代表性的植物根际土,各约100 g,土样的采集过程参考文献^[10]进行,戴一次性手套和口罩、采样工具也浸泡过氧乙酸,迅速将土样分装于速封袋中,贴上标签后带回实验室保存,以供分离放线菌之用。土样概况及草本科植物的概况见表1。

表1 土样概况

Table 1 The situation of soil samples

土样编号 Number	植被类型 Vegetation	采集时间 Collecting time	采集地经纬度 Latitude and longitude		海拔高度 Altitude (m)	采样深度 Depth (cm)
			经度 Latitude	纬度 longitude		
1	蒲公英 <i>T. mongolicum</i>	2016.7	104°17'17'' E	35°94'10'' N	1821	0~20
2	蜀葵 <i>A. rosea</i>	2016.7	104°17'27'' E	35°94'01'' N	1821	0~20
3	蒜叶婆罗门参 <i>T. porrifolius</i>	2016.7	104°16'15'' E	35°94'21'' N	1821	0~20
4	商陆 <i>P. acinosa</i>	2016.7	104°16'17'' E	35°94'31'' N	1821	0~20
5	马齿苋 <i>P. oleracea</i>	2016.7	104°16'97'' E	35°94'43'' N	1821	0~20
6	三叶草 <i>Trifolium</i>	2016.7	104°16'43'' E	35°94'45'' N	1821	0~20
7	黄花补血草 <i>L. aureum</i>	2016.7	104°15'61'' E	35°94'21'' N	1940	0~20
8	红景天 <i>R. rosea</i>	2016.7	104°14'91'' E	35°95'10'' N	1962	0~20

2.2 8种土样系列温度处理

将蒲公英、蜀葵、蒜叶婆罗门参、商陆、马齿苋、三叶草、黄花补血草、红景天等8种草本科植物根际土样3 g分别在23、60、80、100℃和120℃五个不同温度下干热处理1 h。

2.3 菌株分离纯化

为了抑制细菌和真菌的生长,在放线菌分离培养基加入抑菌剂,系列温度干热处理1 h后用27 mL 6%的酵母提取物溶液和270 μL 5%的SDS溶液的混合液作为土样提取液。采用稀释涂布平板法进行分离,计数、纯化、保藏用常规方法。

2.4 功能酶产生菌的筛选

经过一系列温度筛选,然后对获得菌株按照以下方式进行功能酶菌株的筛选。

2.4.1 色氨酸酶

将1%胰胨水溶液调至pH 7.6,分装1/3试管,115℃灭菌30 min备用;取对二甲基氨基苯甲醛8 g,用760 mL乙醇(95%)和160 mL浓HCl配成试剂备用。挑取试验菌接种于液体培养基(灭菌的1%胰胨水溶液)中,每次两个重复,置22℃培养,

培养4、7 d的培养液,沿管壁缓缓加入5 mL的试剂于培养液表面,阳性表现为液层界面为红色,若此时颜色不明显,可在培养液中加入5滴乙醚,轻轻摇动,使乙醚充分分散于液体中,静置片刻后继续添加试剂。

2.4.2 过氧化氢酶

挑取实验菌株于干净的载玻片上,滴加4滴过氧化氢溶液,观察结果。阳性表现为0.5 min内产生大量气泡,反之为阴性。

2.4.3 脲酶

提前将30%的尿素用乙醚消毒,待培养基冷却至55℃时将无菌尿素加入,使尿素终浓度为2%,备用。将实验菌株接种于培养基中,22℃条件下培养4 d,观察培养基的颜色。

2.4.4 酯酶

聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯酶(底物吐温-20)、聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯酶(吐温-40)、聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯酶(吐温-80)分别于1×10⁵ Pa灭菌20 min。待基础培养基(配方如表5)冷却至50℃时,分别加入上述三种无菌吐温至终浓

度为1%,倒平板。划线接种实验菌于平板,培养一至两周,每天观察。阳性表现为生长的周围有模糊晕圈;否则为阴性。

2.4.5 蛋白酶

将实验菌接种于明胶培养基表面,22℃培养一周,观察其液化程度。

2.4.6 淀粉酶

采用点接法接种试验菌于淀粉培养基,培养2周,待菌生长良好时,在菌落周围滴加碘液,观察是否有透明圈形成。

2.4.7 纤维素酶

将滤纸条一端接种于液体培养基中,灭菌后将试验菌接种在液面以上的滤纸条上,一个月后观察滤纸条是否被分解^[11]。

2.5 代谢产物测定

将筛选得到的功能酶产生菌按照以下方式进行代谢产物的生理生化检测^[12]。

2.5.1 MR实验

将实验菌接于液体培养基(配方如表2)中,每次需三个重复,置22℃培养箱培养6d,在培养液中加入一滴甲基红试剂,阳性反应表现为红色,黄色则为阴性(甲基红变色范围为pH 4.4红,pH 6.0黄)。

2.5.2 硫化氢的产生

将实验菌种接种于柴斯纳培养基(配方如表3)上培养,观察2周后,黑色素产生的即为产生了硫化氢。

3 结果与分析

3.1 温度对放线菌菌种筛选的影响

本研究中多种土样经过不同温度处理后,放线菌的数量和种类如图1、图2所示。从图1可以看出每种土壤的放线菌数量均随着温度的升高大至呈降低趋势,说明高温在减少细菌和真菌的同时也抑制了一些放线菌的生长;结合图2可以看出同一土样在不同温度下放线菌的种类与温度没有相关性,但是特定的温度会产生特定的菌,即某些菌对温度有一定的选择性,关于这一点还需要深入的研究。

蒜叶婆罗门参、马齿苋、三叶草和黄花补血草等四种来源的菌在60℃时被乳状透明细菌污染,明显看到放线菌对环境的依赖性及对特定温度的选择性。这与司美茹等人研究认为的“120℃×10h加热预处理土样,有利于放线菌孢子萌发,增加放线菌的数量和种类”的结果相反^[13],主要原因可能是本

研究中所选土样采自西北民族大学榆中校区几个高海拔植物根系,推断其中的几株放线菌偏向嗜冷菌。因此,在分离放线菌时有必要根据其生存环境来设计放线菌的分离方案,从而达到预期效果。

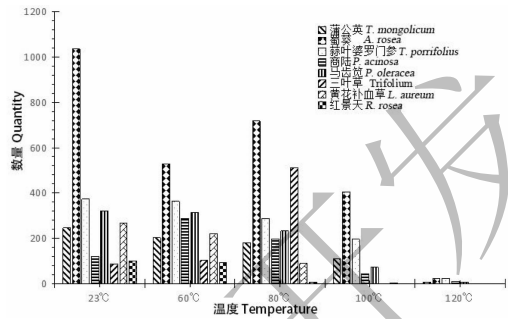


图1 温度对放线菌数量的影响

Fig. 1 Effect of temperature on the number of actinomycetes

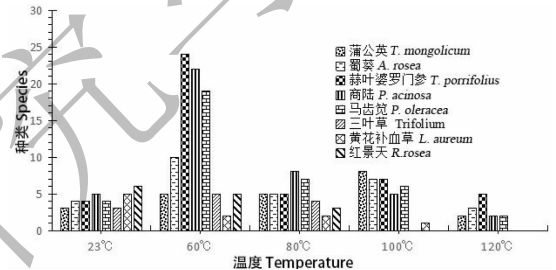


图2 温度对放线菌种类的影响

Fig. 2 Effect of temperature on the species of actinomycetes

3.2 产功能酶菌株的筛选

系列温度处理后,按照功能酶筛选的步骤进行筛选,得到18株放线菌,23、60、80、100℃和120℃条件下的放线菌种类分别为4种、7种、5种、6种和3种,但有些放线菌并非只在某一个特别温度下才有,比如QL02,在60℃和80℃下都能筛到功能菌,比如QL03,在100℃和120℃下都能筛到功能菌,其它具体信息如下表2所示,可知放线菌的功能多样性。

然后,对这18株形态各异的放线菌做了功能酶菌株筛选,检测结果如表3所示:发现18株放线菌中有9株放线菌产淀粉酶,16株产蛋白酶,16株产脲酶,18株产过氧化氢酶,12株产聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯酶,14株产聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯酶,7株产聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯酶,5株产色氨酸酶,5株产纤维素酶。并且过氧化氢酶产生菌数量最多,这可能与榆中地区低温、强辐射、干燥等环境有关,还需进一步研究。

表2 筛选菌种的信息

Table 2 Screening bacteria information

菌株编号 Strains No.	土样 Soil samples	筛选温度 Filter temperature (°C)
QL01	蒲公英 <i>T. mongolicum</i>	60
QL02	蒲公英 <i>T. mongolicum</i>	60、80
QL03	蒲公英 <i>T. mongolicum</i>	100、120
QL04	蜀葵 <i>A. rosea</i>	23
QL05	蜀葵 <i>A. rosea</i>	60、80
QL06	蒜叶婆罗门参 <i>T. porrifolius</i>	100
QL07	蒜叶婆罗门参 <i>T. porrifolius</i>	120
QL08	商陆 <i>P. acinosa Roxb</i>	60、80
QL09	商陆 <i>P. acinosa Roxb</i>	100
QL10	马齿笕 <i>P. oleracea</i>	23
QL11	马齿笕 <i>P. oleracea</i>	60
QL12	马齿笕 <i>P. oleracea</i>	80、100
QL13	三叶草 <i>Trifolium</i>	23
QL14	黄花补血草 <i>L. aureum</i>	23
QL15	黄花补血草 <i>L. aureum</i>	60
QL16	黄花补血草 <i>L. aureum</i>	80、100
QL17	红景天 <i>R. rosea</i>	60
QL18	红景天 <i>R. rosea</i>	100、120

表3 功能酶产生菌筛选结果

Table 3 The screening results of functional enzyme producing bacteria

菌株编号 Strains No.	淀粉酶 Amylase	蛋白酶 Protease	纤维素酶 Cellulase	尿素酶 Urease	过氧化氢酶 Catalase	色氨酸酶 Tryptophanase	聚氧乙烯 失水山梨 醇单月桂 酸酯酶 Twain-20	聚氧乙烯失 水山梨醇 脂肪酸酯酶 Twain-40	聚氧乙烯山 梨醇单油 酸酯酶 Twain-80
QL01	-	+	-	+	+	+	+	+	-
QL02	-	+	-	+	+	-	+	+	-
QL03	+	+	+	+	+	-	+	+	+
QL04	-	+	-	+	+	+	-	+	-
QL05	+	+	-	+	+	-	+	-	+
QL06	+	+	+	-	+	-	-	+	+
QL07	-	+	-	+	+	-	-	-	-
QL08	+	+	+	+	+	+	+	+	-
QL09	-	+	-	+	+	-	-	+	-
QL10	+	-	+	+	+	-	+	-	+
QL11	-	+	-	+	+	-	+	+	+
QL12	+	+	-	+	+	+	+	+	-
QL13	+	-	-	-	+	-	+	-	-
QL14	-	+	-	+	+	-	-	+	+
QL15	+	+	+	+	+	-	+	+	+

续表3(Continued Tab. 3)

菌株编号 Strains No.	淀粉酶 Amylase	蛋白酶 Protease	纤维素酶 Cellulase	尿素酶 Urease	过氧化氢酶 Catalase	色氨酸酶 Tryptophanase	聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯酶 Twain-20	聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯酶 Twain-40	聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯酶 Twain-80
QL16	-	+	-	+	+	+	+	+	-
QL17	+	+	-	+	+	-	+	+	-
QL18	-	+	-	+	+	-	-	+	-

注: +:阳性; -:阴性。 Note: +:Positive; -:Negative.

不同温度处理下的菌产酶情况不尽相同,以下图3(A~E)分别是23、60、80、100℃和120℃条件下处理菌株产酶情况的图例,23℃时产淀粉酶产量最多,18株菌都不产过氧化氢酶;60℃时也是淀粉酶产量最多,但最少的酶是聚氧乙烯山梨醇酐单油酸酯酶;80℃时淀粉酶和过氧化氢酶的量一样多,尿素酶和聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯酶一样,量少;100℃时最多的是纤维素酶,其它差异不大,尿素酶相比较少些;120℃筛的3株菌所有酶都有代谢,且量都多,差异不大。温度越高,环境越恶劣,能

生长得放线菌功能越强大,产生的酶更丰富。

放线菌对环境的选择有多样性,在不同温度下产功能酶的量也不同,菌种要在适当温度下生存,需要各种各样的酶来维持,当处于极端恶劣环境时,营养物质资源匮乏,菌株需要合成一些抗性物质来弥补自身营养物质的缺乏,以达到抑制细菌、真菌甚至另类放线菌,从而取得绝对的生长优势。因此,植物体的选择作用和土壤微环境的压力使高山植物根系土放线菌具有产新型生物活性化合物的潜力。

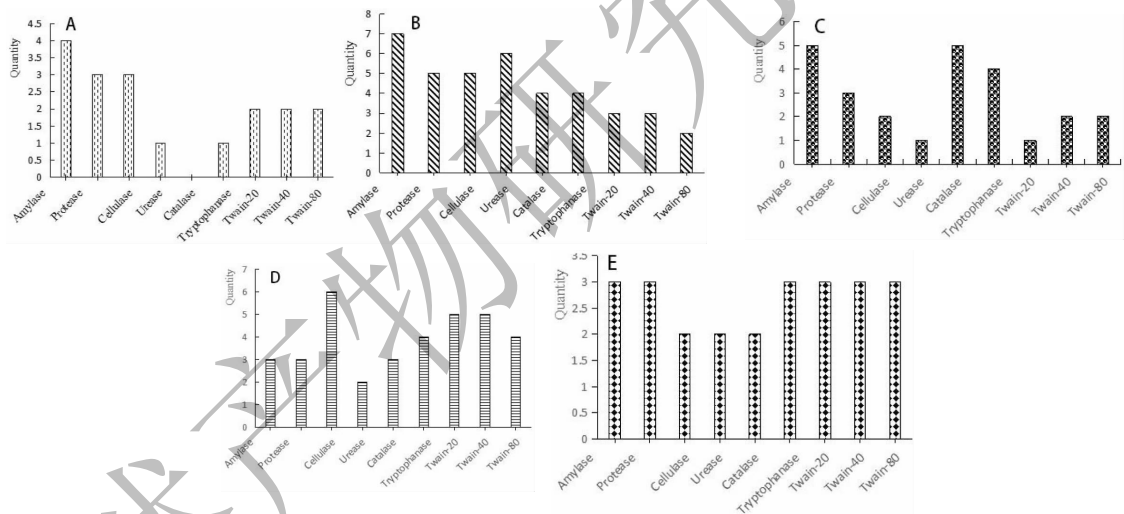


图3 23℃(A)、60℃(B)、80℃(C)、100℃(D)及120℃(E)条件下处理菌株产酶情况

Fig. 3 Enzyme producing under 23 (A), 60 (B), 80 (C), 100 (D) and 120℃ (E)

3.3 代谢产物生理生化测定结果

此外,对这8种草本科植物根际土壤中分离到的18株产功能酶菌依次按照以下方式进行代谢产物的测定,结果如表4,QL07、QL12和QL18这3株放线菌在糖代谢过程中产生有机酸,QL04、QL08和QL18产生 H_2S ,可能与土壤有机物和多聚物分解、养分循环利用有关。

4 讨论与结论

放线菌产生丰富的次级代谢产物作为工业、农

业、食品业、医药等行业的重要资源之一,倍受国内外学者的关注^[14]。一些功能酶,比如蛋白酶、淀粉酶、酯酶在很多领域都具有很大的利用价值,例如纤维素酶,可降解全球分布最广、含量最丰富的碳源,更重要的是数量最大,并且永不枯竭^[15]。纤维素酶还可以降解纤维素得到葡萄糖,因此,对纤维素酶的研究开发和应用是一条重要的新的资源利用途径。随着放线菌菌种分离、纯化、培养、鉴定等技术的发展,微生物与植物之间相关的各类信号分子及其功能的挖掘已经成为目前研究的热点^[16,17]。放线菌

发酵的次级代谢产物更是有待开发的宝藏,目前对几株功能菌株进行发酵,代谢产物经过提取^[18-20]、发酵工艺优化、产物分离纯化以及液相-质谱联用鉴定^[21],并且体内外试验等进一步研究得知此代谢产物具有抑菌^[22]、甚至抗癌^[23,24]的功效。挖掘更多的放线菌新种属、发现更多结构新颖、用途广泛的次级代谢产物具有重要作用。

表4 菌株生理生化结果

Table 4 Physiological and biochemical analysis results of different strains

菌株编号 Strains No.	甲基红检测 Methyl red detection	硫化氢检测 Hydrogen sulfide detection
QL01	-	-
QL02	-	-
QL03	-	-
QL04	-	+
QL05	-	-
QL06	-	-
QL07	+	-
QL08	-	+
QL09	-	-
QL10	-	-
QL11	-	-
QL12	+	-
QL13	-	-
QL14	-	-
QL15	-	-
QL16	-	-
QL17	-	-
QL18	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性。 Note: +: Positive; -: Negative.

西北民族大学榆中校区独特的土壤环境条件强烈影响并决定着其中放线菌的数量和种类,要从植物根系土中获得更多的放线菌纯培养,就需要依据其生境特征来设计一套相应的培养基和分离方法。本试验采用5%的SDS和6%的酵母提取物作为土壤提取液,效果明显,SDS在放线菌的分离过程中,主要起抑制细菌生长和激活放线菌孢子的作用^[25]。酵母提取物也是放线菌孢子激活剂。不同温度对土样预处理结果显示,温度会抑制一些放线菌的生长,但同时又会促进某些放线菌的生长,因此在选择温度作为土样的预处理时,要依据放线菌所处的环境,选择合适的温度,并非高温一定能促进孢子萌发,高

温也会杀死孢子。随着温度的筛选,得到一些产功能酶的放线菌,值得进一步研究和利用。

综上所述,在选择土样的预处理方案时,应综合考虑土壤类型及其相关的基本性质,做到“有的放矢”,这样才能使土壤中的放线菌尽可能多的被筛选出来。在根际这个特殊的生态系统中,根际微生物可以通过根际“对话”如产生生长素,赤霉素或激动素类物质影响植物生长。以往有关根际微生物-植物间“对话”的研究多集中在细菌和真菌^[26],本文选取了西北民族大学榆中校区8种草本科植物根际土作为放线菌的分离源,将进一步研究放线菌与草本科植物间的“对话”^[26]对放线菌的生理产生的影响,为今后的抑菌^[22]、抗癌^[23,24]方面的研究打下基础。

参考文献

- Jiang CL (姜成林), Xu LH (徐丽华). *Industrial Microbes* (工业微生物), 1989, 19(6): 31-35.
- Zhang JZ (张纪忠), Huang JJ (黄静娟), Sheng ZD (盛宗斗), et al. *Microbiological taxonomy* (微生物分类学). Shanghai: Fudan University Press, 1985. 214-218.
- Xu XY (胥秀英), Zheng YM (郑一敏), Wen SZ (温寿祯), et al. A preliminary study on the isolation method of soil actinomycetes. *J Biol* (生物学杂志), 2000, 17(2): 16-17.
- Jiang Y (姜怡), Duan SR (段淑蓉), Tang SK (唐蜀昆), et al. Method for separation of rare actinomycetes. *Microbiology China* (微生物学通报), 2006, 33(1): 181-183.
- Yuan LJ (袁丽杰), Zhang GL (章广玲), Zhang YQ (张玉琴), et al. Preliminary research about population diversity and biological of rhizosphere actinomycetes from medicinal plants. *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2009, 34: 463-466.
- Song XQ (宋现芹), Jiang X (蒋鑫), Sun JB (孙建彬), et al. Antibacterial secondary metabolites produced by mangrove-derived actinomycete *Streptomyces costaricanus* SCSIO ZS0073. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 410-414.
- Cao LL, Wang Y, Tang SK. Biodiversity and enzyme screening of actinomycetes from Hami Lake. *Acta Microbiol Sin*, 2009, 49: 287-293.
- Ma AA (马爱爱), Xu SJ (徐世健), Min YX (敏玉霞), et al. Phylogenetic and physiological diversity of actinomycetes isolated from plant rhizosphere soils in the Qilian Mountains. *Acta Ecol Sin* (生态学报), 2014, 34: 2916-2928.
- Ruan JS, Huang Y. Rapid identification and systematics of actinobacteria. Beijing: Science Press, 2011.

- 10 Tan YJ (谭悠久), Peng Y (彭祜), Huang YC (黄永春). Selective separation of actinomycetes from soils and rapid evaluation of antiphytopathogenic activity of their metabolites. *J Plant Protect* (植物保护学报), 2011, 37:120-123.
- 11 Zhao XL (赵晓璐), Zhou N (周宁), Xie QW (谢庆武), et al. Isolation and identification of cellulose endophytic fungi from lotus leaves. *China Food Additi* (中国食品添加剂), 2017, 1:71-76.
- 12 Tian H (田惠). Isolation, identification and antibacterial activities of secondary metabolites of *Streptomyces cuspidosporus* SN0280. Shenyang: Shenyang Agricultural University (沈阳农业大学), PhD. 2017.
- 13 Si MR (司美茹), Xue QH (薛泉宏), Lai HX (来航线). Method for separation of rare actinomycetes. *Microbiology China* (微生物学通报), 2004, 31(2):61-65.
- 14 Li SW (李师翁), Kong K (孔凯), Feng JL (冯佳丽), et al. Screening and identification of a cold-adapted cellulase-producing actinomycete and characterization of cellulase. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2010, 7:216-220.
- 15 Zhang XJ, Zheng WL, Lan XZ, et al. The preliminary study on the rhizosphere microbes of *Rhodiola fastigiata* in Sehgyala Mountains. *Chin Agric Sci Bull*, 2011, 27:172-177.
- 16 Shen RF (沈仁芳), Sun B (孙波), Shi WM (施卫明), et al. Interactions between above-and below-ground organisms for Nutrient-efficient Utilization. *Bull Chin Acade Sci* (中国科学院院刊), 2017, 6:566-574.
- 17 Chen Y (陈伊), Li Z (李舟), Wei YZ (魏玉珍), et al. Studies on the nucleoside antibiotics 3431 produced by rhizosphere actinomycete I 06203431. *J Biol* (生物学杂志), 2009, 26(4):17-20.
- 18 Guo NY (郭娜燕), Lv GR (吕国荣), Qiu DY (邱丹纓). Review on alkaloids from marine-derived actinomycetes. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29:159-171.
- 19 Xie SY (谢沈阳), Yang XY (杨晓源), Ding ZG (丁章贵), et al. Chemical constituents and pharmacological effects of *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24:141-151.
- 20 Zhao J (赵军), Sun YH (孙玉华), Xu F (徐芳), et al. Study on flavonoids of *Coreopsis tinctoria* Nutt. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2013, 25:50-52.
- 21 Wang DB (汪殿蓓), Li JH (李建华). Optimization of composite enzymatic extraction of polyphenols from the fruit of *Abelmoschus moschatus*. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:909-914.
- 22 Hu LF (胡林峰), Xu ML (许明录), Zhu HX (朱红霞). Advances in antimicrobial activity of plant essential oil. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2011, 23:384-391.
- 23 Jin LM (金黎明), Xu X (徐鑫), Bao YC (包艳春). New research progress on antitumor natural products from marine-derived fungi. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29:152-158.
- 24 Zhou JY (周洁芸), Zhu Y (朱焰). Progress in antitumor effects of artemisinin and its derivatives. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 26:975-981.
- 25 Zhang BH (张炳火), Li HQ (李汉全), Luo JY (罗娟艳), et al. Influences of actinomycete strain JXJ-0136 on the growth of *Brassica chinensis* and *Vigna unguiculata* and its phosphate solubilization. *Scient Agric Sin* (中国农业科学), 2016, 49:3152-3161.
- 26 Ma AA, Zhang XF, Zhao L, et al. Diversity and physiological activity of *Streptomyces* spp. isolated from permafrost of the Qinghai-Tibetan Plateau. *J Glaciol Geocryol*, 2012, 34:1508-1516.
- (上接第 1850 页)
- 17 Song HL (宋海龙), Zheng Y (郑焱), Wang XM (王晓明). The regulation of CREB signaling pathways in nervous system functions. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2013, 29:797-804.
- 18 Canal CE, Chang Q, Gold PE. Intra-amygdala injections of CREB antisense impair inhibitory avoidance memory: role of norepinephrine and acetylcholine. *Learn Mem*, 2008, 15:677-686.
- 19 Yi XF (易显富), Peng L (彭力), Zhang ZY (张泽月), et al. Influence of electroacupuncture on cAMP/PKA/CREB signal transduction pathways in β 25-35 induced Alzheimer's disease model rats. *J Chin Prac Diag Ther* (中华实用诊断与治疗杂志), 2014, 28:128-130.