

第一章

中国盐湖

第一节 盐湖的形成条件

盐湖,是湖水含盐量达到 50g/L 以上的湖泊;或者是湖水含盐量低于 50g/L,但湖内或湖边有盐类存在的湖泊;或者是湖盆虽然没有水,但有盐类沉积的湖泊。因此,通常把含盐量或矿化度达到或超过 50g/L 的湖水称为卤水,有时也称矿化水(郑喜玉,2002)。通常要形成这些盐湖则必须满足如下三个条件。

首先,要有一个封闭或半封闭的汇水湖盆地。这样封闭的地形才能够使得流域内的径流、雨水等向湖泊内汇集,湖水不致外泄,从而形成聚集态。

其次,要有丰富的盐类物质汇入湖盆。丰富的盐分通过径流源源不断地从流域内向湖泊输送,才能够保证一定的盐度。不同盐湖里的盐分来源是多种多样的,比如海成盐湖的盐分主要来源是海水;而对我国大陆盐湖而言,绝大多数与海水没有直接关系,其盐分主要来源于地表岩石风化、地球内部岩浆中的盐分以及古代沉积的盐类再溶解和深部水等。在滨海地区,海水较浅,海流和海浪长期冲刷和侵蚀海岸线,被冲蚀下的沙石在离海岸一定的地区堆积下来形成沙洲;或者由河流携带泥沙入海,在距河口一定地方堆积下来形成沙洲,并逐步隔离靠近大陆的部分海域而形成盐湖。中国近代的盐湖,均属于大陆盐湖。在盐湖地区,常常可以看到环湖有一圈圈银白色的盐带,宛若戴在盐湖上的美丽项圈。这种自然现象,是盐类物质自流域向盐湖迁移的一个有力的证据。因为溶解于水体中的各种盐类在从流域向盐湖的迁移过程中,水分逐渐蒸发,浓度不断增大,一旦达到饱和或过饱和状态,就会产生沉淀作用。但是由于各种盐类的溶解度不同,呈现出一定的沉淀顺序,从物质来源的上游到盐湖之间,各种盐类沉积物有明显的环带状分布规律。

最后,湖泊地区要有持续干旱的气候条件。这些干旱气候在有丰富盐分来源的湖水存在的条件下,基于强烈的蒸发作用,湖水越来越咸,盐分越积越多,久而久之,就形成了盐湖。通常,在干旱或半干旱的气候条件下,湖泊的蒸发量往往超过湖泊的补给量,湖水不断浓缩,含盐量日渐增加,使水中各种元素达到饱和或过饱和的状态,在湖底形成了各种不同盐类的沉积矿床。位于柴达木盆地

的察尔汗盐湖深居内陆,四周为绵延的山脉所屏障,空气干燥,这里的蒸发量远远大于降水量,从而最终形成盐湖。而在新疆塔克拉玛干沙漠内部,沙丘绵亘,地表无径流产生,中间比较平坦,无封闭的湖盆区,盐类虽然很多,但都呈分散状态,而难以形成盐湖。

第二节 盐湖的分类

世界上盐湖有很多类型,盐湖分类的依据不同,类型也不一样。划分盐湖类型的原则主要有三种:一是按盐湖卤水赋存状态分类,二是按盐湖的主要盐类沉积物分类,三是按卤水的化学成分分类。

按盐湖卤水赋存状态,盐湖可分为卤水湖、干盐湖和沙下湖。卤水湖的特征是一年四季湖盆中都有表面卤水存在,而盐类沉积仅见于岸边或湖底某些部位;湖水在一年四季中有涨有落,但湖中总有自由表面卤水。干盐湖的主要特征是在一年内绝大部分时间是干枯的,只有在潮湿季节才有暂时性的表面卤水。裸露地表的干盐滩由于日晒和强烈蒸发,地下卤水析盐膨胀造成地表龟裂,更由于常年风吹、雨淋、日晒蒸发,形成了巨大的盐壳。察尔汗就是一个巨大的干盐湖。沙下湖是以全年内均无表面卤水为特征的一类盐湖。晶间卤水的水位远比干盐湖的埋藏深度高,并且因卤水很少跟外界交换,水位较为平稳,只有降水下渗或盐类自析才稍稍引起水位的微小波动。沙下湖另一个直观的特点是在其盐类沉积的顶部往往有或厚或薄的浮土和流沙覆盖,全年均无地表径流的补给。

按盐类矿产种类划分,不仅有最为常见的石盐湖、芒硝湖和天然碱湖,也有石膏湖、钾镁盐湖、硼湖、锂湖,以及世界罕见的硝酸(钾)盐湖。

按盐湖卤水水化学成分分类在我国盐湖分类上应用最广泛,可分为碳酸盐类型、硫酸盐类型(包括硫酸钠亚型和硫酸镁亚型)和氯化物类型。卤水化学成分分类指明了湖水物理化学作用的特点和水盐平衡体系。

依据湖水含盐量或矿化度,目前我国湖泊主要划分为 6 种类型,如表 1-1 所示。

表 1-1 我国湖泊类型	
湖泊类型	划分标准
淡水湖	湖水矿化度小于或等于 1g/L
微咸水湖	湖水矿化度大于 1g/L,小于 35g/L
咸水湖	湖水矿化度大于或等于 35g/L,小于 50g/L
盐湖	湖水矿化度大于或等于 50g/L

续表

湖泊类型	划分标准
干盐湖	没有湖表卤水,湖表有盐类沉积的湖泊;湖表往往形成坚硬的盐壳
沙下湖	湖表面被沙或黏土粉砂覆盖的盐湖

第三节 中国盐湖资源及其分布

全球的盐湖按产出盐类矿产组成和地质构造背景差别可以分为两类:一种是普通盐湖,多分布于稳定构造区,产出石盐、芒硝、碱类、石膏和硫酸镁盐等一般性矿产,广泛分布于克拉通、地台等稳定构造区,如西伯利亚、澳洲、蒙古、鄂尔多斯等地区;另一种是特种盐湖,绝大多数分布于活动构造区,除有普通型盐类矿产外,还产出锂、钾、镁、硼、溴、钨、铯、铷、铀、锶等。盐是一种重要资源。食盐既是人类必需的一种物质,又是极为宝贵的化工原料。广大的盐湖就是一个取之不尽、用之不竭的盐类化工原料的“聚宝盆”。盐湖资源的用途很广,如盐湖中出产的食盐,是人类必备的调味品;盐湖中出产的钾盐,可以用来生产钾肥;盐湖中出产的镁盐,可以提炼镁,常用于钢铁、化学、建材和纺织工业等;盐湖中出产的天然碱,用途更是广泛,在日常生活中,常用它去油垢、清洗用具,而且在纺织、化工、医药等部门更是少不了它。

在这个可以生活的行星地球上,盐湖主要呈带状分布在南、北两个半球上。由于地理环境和气候条件的影响,全球盐湖主要分布在北半球盐湖带、南半球盐湖带以及赤道盐湖区上。位于南纬 18°~42°的盐湖称为南半球盐湖带;位于北纬12°~63°的盐湖称为北半球盐湖带,其中北纬 15°~35°之间是世界上盐湖分布最多、最集中的盐湖带。还有少数盐湖分布在非洲赤道附近,构成赤道盐湖区。

我国盐湖集中于北纬 30°~50°,呈蘑菇状由东向西分布,属于世界北半球盐湖带的亚、非、欧大陆盐湖区的最东缘,称为中国盐湖带。这个区域散布着众多的盐湖,其分布之广、海拔之高、资源之丰富、数量之密集在世界盐湖中亦属罕见。我国盐湖几乎完全集中在广大的内流湖区,据统计,我国面积大于 1km²的内陆盐湖有 813 个,占全国湖泊(面积大于 1km²)总面积的 29%,但盐湖面积占全国湖泊面积的 50% 以上,是世界上盐湖分布最多的国家之一。我国的盐湖分布不均匀,新疆、西藏、内蒙古、青海四个省区是我国主要盐湖分布区,有 792 个大于 1km²的盐湖,占我国盐湖总面积(面积大于 1km²)的 99.2% (张彭熹,1999;郑喜玉,2002;李世杰,2007;赵文,2010),如表 1-2 所示。其中著名的罗布泊、青海湖、茶卡盐湖等都分布在这些区域。

表 1-2 我国盐湖分布概况

地区	项目	盐湖数目/个	占盐湖总数/%	盐湖面积/km ²	占盐湖总面积/%
	西藏	234	28.8	8150.2	20.5
	青海	71	8.7	18986.4	47.8
	新疆	112	13.8	10789.6	27.2
	内蒙古	375	46.1	1441.2	3.6
	吉林	2	0.3	63.8	0.2
	河北	2	0.3	54.7	0.2
	山西	1	0.1	92.0	0.2
	陕西	9	1.1	52.1	0.1
	宁夏	4	0.5	19.4	0.1
	甘肃	3	0.4	53.0	0.1
	合计	813	100.0	39702.4	100.0

注：表内仅统计面积在 1km² 以上的内陆盐湖（郑喜玉，2002）。

我国的盐湖资源丰富,为我国发展战略战略性新兴产业奠定了资源基础,随着盐湖综合利用开发技术的日益成熟,能够为新能源等产业提供价格便宜的碳酸锂原料,能够降低新能源汽车的成本,将促进这些战略性新兴产业的发展。此外,我国盐湖中还有大量具有重要经济价值的嗜盐藻、嗜盐菌、盐卤虫、螺旋藻、轮虫等特异生物资源和耐旱、耐盐碱基因资源,同时也是重要的旅游资源和医疗淤泥资源。

第四节 盐湖放线菌资源的开发与保护

我国是世界上盐湖分布最广的国家,面积大于 1km² 的盐湖有 813 个。然而,近 40 年来,随着工农业生产与盐湖生态环境的不断恶化,我国盐湖分布面积急剧萎缩。根据《中国盐湖志》《人民日报》(2012 年 4 月 26 日)、中国科学院盐湖研究所以及“第十二届国际盐湖会议”(2014 年 7 月 14—18 日)的阐述,位于内蒙古、河北等地的 280 多个盐湖已经干涸;位于新疆的 211 个盐湖仅仅剩下 17 个有湖表卤水。伴随着盐湖生态的持续恶化,不可避免的是盐湖中独特的放线菌资源还没来得及开发就已经消失了。可以想象,再过 30 年,我国含卤水的盐湖还有几个?还将有多少个盐湖继续消失? 因此,加快我国盐湖放线菌资源的挖掘与保护已经到了刻不容缓的地步。据 Whitman 等(1998)的估计,地球上的原核生物约有 4 × 10³⁰ ~ 6 × 10³⁰ 种,而人们获得的原核生物的物种数量仅为自然界存在的 1%;嗜盐

放线菌则发现的数量更少。

极端环境微生物被认为是地球上最大的尚未被开发的极具应用潜能的一类生物类群。生命世界最令人难忘的特征之一是独特的地理分布造就的极端生命的充分多样性。这些极端微生物的多样性是基于地理隔离和遗传漂变的介导,使种群产生了对异质性环境的局域适应,并逐渐趋异快速分化为不同的新物种(Flaxman等,2013;Shafer,2013)。通常,隔离程度高的区域往往特有物种区域分布也更丰富,而且这个区域被隔离的越久则它的特有性物种的分类地位也就越高,异域物种分化形成新物种的概率也越大(Cox,2010)。本书中阐述的盐湖气候干旱、高盐、高辐射,是地理隔离程度极高的封闭性内陆盐湖,也是异域分化产生放线菌新物种资源的天然实验室。这些天然封闭性的原始环境非常稳定,碳源代谢多样性更高,人为影响性低;高水平的空间地理隔离也保持了较少的竞争对手,从而展现出更为丰富的极端微生物多样性。那么这些盐湖放线菌资源丰度如何?群落组成有哪些?有多少的新物种?分类地位是否更高级?这些新物种开发潜力如何?盐湖高浓度的硫酸盐、碳酸盐、硼酸与锂元素等对区域性放线菌独有物种的形成产生怎样的影响?是否存在产生新型天然产物的放线菌等问题都非常值得去深入探索与挖掘。盐湖作为人类生态链上的重要一环,也更需要人们的保护与认知。

参考文献

- [1] Cox CB, Moore PD. Biogeography: an ecological and evolutionary approach [M]. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2010.
- [2] Flaxman SM, Feder JL, Nosil P. Genetic hitchhiking and the dynamic buildup of genomic divergence during speciation with gene flow [J]. Evolution, 2013, 67: 2577 - 2591.
- [3] Shafer ABA, Wolf JBW. Widespread evidence for incipient ecological speciation: a meta - analysis of isolation - by - ecology [J]. Ecol Lett, 2013, 16: 940 - 950.
- [4] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority [J]. Proc Natl Acad Sci, USA. 1998, 95: 6578 - 6583.
- [5] 李世杰. 中国湖泊的变迁 [J]. 森林与人类, 2007, 7: 8 - 25.
- [6] 张彭熹, 张保珍, 唐渊, 等. 中国盐湖自然资源及其开发利用 [M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [7] 赵文. 中国盐湖生态学 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [8] 郑喜玉, 张明刚, 徐昶, 等. 中国盐湖志 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.

第二章

中国盐湖可培养放线菌的分离与物种多样性

放线菌的研究历史已经有 100 多年。近 5 年,在放线菌物种资源的研究上,韩国、美国、中国、德国、日本的研究走在了世界的前列。至 2009 年,发现的放线菌一共有 48 个科,219 个属(Zhi,2009),2011 年时已经上升到 54 个科,245 个属(阮继生,2011),放线菌物种资源发展速度可谓相当惊人。实际的微生物种类之多更是无法具体估测。2015 年,细菌域物种(含带有有效命名和暂时命名的物种)序列共有 32564 个,占生命三域的 90.5%,是地球上最为丰富的物种资源,其中放线菌共有 3697 个,占全部原核生物的 11.4%。随着科技发展水平的提高,2017 年细菌序列数快速增长到了 59886 条,如图 2-1 所示(<http://www.ezbiocloud.net/dashboard>);即使人类充分利用他们的智慧所得到的这些物种也仅为实际地球物种数量的 1%。因此,挖掘微生物资源一直是微生物学者的一个艰巨的任重而道远的工作。

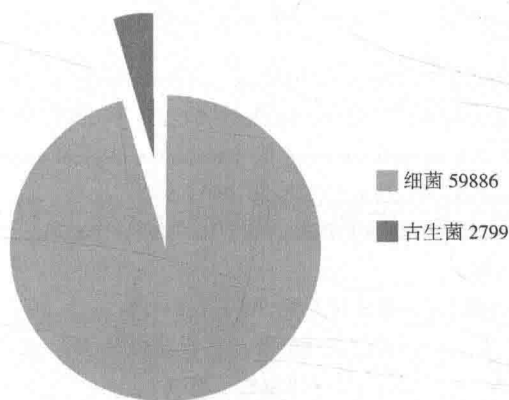


图 2-1 细菌与古生菌的序列数

(引自 <http://www.ezbiocloud.net/dashboard>)

纯培养方法也是最经典的研究放线菌多样性的方法,可以说为放线菌资源的发展做出了卓越的贡献。当前,已有大量有效分离放线菌的手段被各国学者发表,如 Suzuki(1999)报道利用脱脂牛乳能刺激鱼孢菌属(*Sporichthya*)的孢子游动,结合悬浮离心可有效分离动孢菌。Li 等(2002)利用土壤悬浮液经差速离心或极高

频辐射(EHF)处理,有效分离到了珊瑚放线菌属(*Actinocorollia*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、野村氏菌属(*Nonomuraea*)和拟孢囊菌属(*Kibdelosporangium*),提高出菌率10%~20%。Otoguro等人(2001)利用改进的再水化-离心法(rehydration-centrifugation),可有效地高选择性分离束丝放线菌属(*Actinosynnema*)。Li等(2003)将高频辐射法与连续分析相结合,分离到了单独使用两种方法都分离不到的稀有放线菌[珊瑚状放线菌、原小单孢菌、游动放线菌(*Actinoplanes*)和拟孢囊菌(*kibdelosporangium*)]。2003年,Yamamura等人根据放线菌孢子浮力密度的差异,运用蔗糖梯度离心法(SGC)选择性地分离诺卡氏菌(*Nocardia*)获得了成功。国内也有不少学者为放线菌的分离方法做了卓有成效的研究,并发现了许多的放线菌新物种资源(司美茹,2004;姜怡,2006;唐蜀昆,2007)。人们不断地通过完善培养基、优化培养条件、添加抑制剂、模拟原生态环境等方法挖掘放线菌资源,并取得了长足的进步。

第一节 放线菌的分离技术

放线菌与人类的生产和生活关系极为密切,分布环境广泛,目前应用的抗生素约70%是由各种放线菌所产生的。还有一些种类的放线菌能产生各种酶制剂(蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶等)、维生素(维生素B₁₂)和有机酸等。弗兰克菌属(*Frankia*)为非豆科木本植物根瘤中有固氮能力的内共生菌。此外,放线菌还可用在甾体转化、烃类发酵、石油脱蜡和污水处理等方面。少数放线菌也会对人类构成危害,引起人和动植物病害。因此,放线菌与人类关系密切,在医药工业上有重要意义。目前,随着病原菌对抗生素的耐药性的增强,而且普通环境放线菌及其新型天然产物的重复率(95%以上)越来越高,挖掘新型放线菌及其天然产物资源也显得越来越重要。2017年3月,全国“两会”委员也提出应将微生物资源作为国家战略资源加以保护和利用。至今为止,人们只分离到10%~20%的土壤放线菌(Okam,1991)。因此分离另80%的未知放线菌是微生物资源开发的必要前提和关键之一。

放线菌是一类革兰阳性细菌,主要以孢子形式萌发,其孢子对外界刺激具有很强的耐受性,适当的处理能刺激其孢子萌发。而一般细菌细胞壁相对较薄,易发生质壁分离而失去生命力。因此,利用放线菌孢子抗逆性强的特点,在样品分离前进行适当的预处理,可以达到较好的分离效果。样品的预处理目的在于减少真菌、非放线菌型细菌的数量,增加放线菌(尤其是目的放线菌)的数量。目前,放线菌的主要样品处理及其分离方法如下所述。

一、风干处理

根据姜成林等(1985)的报道,将土样自然风干5~30d,可大大减少细菌的数量,

增加放线菌的出菌率。姜怡等(2006)认为土壤风干20d,能使90%以上的细菌死亡,对消除细菌污染很有效。但要分离放线细菌(*Actinobacteria*)时不宜风干土样。

二、加热处理

风干土样在120℃干热处理1h,可减少真菌、细菌的数量,增加产孢子放线菌的出菌率。姜怡等研究认为,风干土壤样品在100℃或120℃干热处理60min,可以有效分离链孢囊菌属(*Streptosporangium*)、小双孢菌属(*Microbispora*)、小四孢菌属(*Microtetraspora*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、游动放线菌属(*Actinoplanes*)等稀有放线菌;60~65℃处理120min,能有效分离小单孢菌属(*Micromonospora*);并且干热处理(120℃,1h)可显著诱导链孢囊菌属(*Streptosporangium*)菌株的生长(Hayakawa, 1991)。天然沉积物样品自然风干后湿热50℃处理6min,然后干热(120℃,1h)预处理,结合1.5%的苯酚,可有效地抑制细菌的生长并刺激稀有放线菌,例如游动放线菌属(*Actinoplanes*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、小双孢菌属(*Microbispora*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)和野村氏菌属(*Nonomuraea*)等分离(Kim, 1995)。

三、抑制剂处理

大量研究发现放线菌酮(100mg/L)、制霉菌素(100mg/L)能有效抑制真菌,同时不影响放线菌的生长。青霉素(1~5mg/L)、链霉素(10~20mg/L)能抑制细菌,但也容易抑制放线菌。分离培养基加入50mg/L的放线菌酮可以选择性分离指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、小双孢菌属(*Microbispora*)、小四孢菌属(*Microtetraspora*)和链孢囊菌属(*Streptosporangium*)等属的菌种。使用25mg/L的放线菌酮和20mg/L的新生霉素,可以分离到游动放线菌属(*Actinoplanes*),用25mg/L的新生霉素和15mg/L的链霉素可以分离到糖霉菌属(*Glycomyces*),用2~5mg/L的庆大霉素可以分离到链孢囊菌属(*Streptosporangium*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、小四孢菌属(*Microtetraspora*)。姜怡等推荐了两组稀有放线菌分离用的抑制剂:100mg/L的放线菌酮(或100mg/L制霉菌素)和20mg/L的萘啶酮酸;50~75mg/L的重铬酸钾。这两组抑制剂都可以很好地抑制真菌和常见细菌,使稀有放线菌的出菌率大大提高。加入卡那霉素、交沙霉素、溶菌酶和萘啶酮酸可以使马杜拉放线菌(*Actinomadura viridis*)出菌率达到65%(Makkar, 1982)。Hayakawa等(1989)研究发现,用0.05%的SD(S5mmol/L磷酸缓冲液配制)加1%的腐殖酸或6%的酵母膏,40℃振荡20min,能有效地分离到小单孢菌属(*Micromonospora*)、孢囊菌属(*Dactylosporangium*)、小双孢菌属(*Microbispora*)、小四孢菌属(*Microtetraspora*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、链孢囊菌属(*Streptosporangium*)。杨宇容等(1995)等研究了不同放线菌对抑制剂重铬酸钾的影响,发现重铬

酸钾是一种可以抑制大多数土壤真菌、细菌,而不抑制放线菌的选择性高、效果好、便宜的抑制剂。Hayakawa(1997)认为用 1.0% 氯胺-T 处理土壤悬液可以使小双孢菌属(*Microbispora*)、小四孢菌属(*Microtetraspora*)和链孢囊菌属(*Streptosporangium*)出菌率达到 40%~56%。苯酚对细菌、真菌和链霉菌均有杀灭作用,可用于放线菌的分离研究,但需要注意的是苯酚毒性大,需要稀释后使用。Khamna(2009)采用 1.5% 的苯酚处理样品,分离获得了马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、小双孢菌属、小单孢菌属、诺卡氏菌属、野村氏菌属(*Nonomurae*)、红球菌属(*Rhodococcus*)以及疣孢菌属(*Verrucosipora*)等稀有放线菌属。Istianto 等采用 1.5% 苯酚预处理后,从泥土样品中得到的小单孢菌属、马杜拉放线菌属、小双孢菌属以及多形态孢菌属(*Polymorphospora*)总和多达 75.4%。基于大多数马杜拉放线菌能够耐受一定浓度的利福平,在葡萄糖-酵母浸膏琼脂(GYEA)培养基中添加适量的利福平(25mg/L)可以有效地抑制细菌和非目的放线菌的生长,而对马杜拉放线菌及其他少量的放线菌如链霉菌(*Streptomyces*)或高温单孢菌(*Thermomonospora*)却几乎没有影响。Mincer 等(2005)在沉积物样品中添加了卡那霉素、万古霉素、庆大霉素以及四环素,利用盐孢菌属(*Salinispora*)放线菌耐药性分离得到 366 株该属放线菌。

四、碳酸盐处理

经碳酸钠处理后的自然样品能分离出更多的稀有放线菌(Alferova, 1988),原野与何山(2014)很好地总结了碳酸盐处理分离放线菌的方法。Tsao 等研究表明:样品与碳酸钙粉末混匀后,pH 的变化有利于放线菌生长且钙离子能刺激放线菌气生菌丝的形成。Qin 等(2009)用碳酸钙富集和再水化-离心法(Rehydration and Centrifugation, RC),首次从内生环境中分离得到糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、芽生球菌属(*Blastococcus*)、指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、厄氏菌属(*Oerskovia*)、珊瑚放线菌属(*Actinocorallia*)以及姜氏菌属(*Jiangella*)等稀有属放线菌。Tiwari(2012)的研究表明,从土壤样品中分离稀有放线菌属时,碳酸钙处理与其他处理方法结合则效果更好。

五、高选择性分离不同类群放线菌的方法

李文均等(2002)综述了几种稀有放线菌的选择性分离方法,其中链孢囊菌的分离程序:土样自然风干→120℃干热预处理 1h→制备土壤悬浮液(10^{-1})→0.01% 苜蓿素氯铵 30℃处理 30min→(10^{-3} , 0.1mL)涂布平板(HV 琼脂+萘啶酮酸 20mg/L+吉他霉素 1mg/L)。选择性分离指孢囊菌的程序为:土样自然风干→100℃干热预处理 15min→制备土壤悬浮液(10^{-1})→0.03% 苜蓿素氯铵 30℃处理

30min $\rightarrow$ (10^{-3} , 0.1mL)涂布平板(HV琼脂+萘啶酮酸 20mg/L+衣霉素 10mg/L)。高选择性分离小单孢菌的程序为:土样自然风干 $\rightarrow$ 制成土壤悬浮液(10^{-1}) $\rightarrow$ 1.5%苯酚 30℃处理 30min(10^{-2}) $\rightarrow$ (10^{-4} , 0.2mL)涂布平板(HV琼脂+萘啶酮酸 20mg/L+衣霉素 20mg/L)。分离平板的总菌落数随土样而不同,有 60%~100%是小单孢菌(Hayakawa, 1991)。衣霉素和萘啶酮酸作为细菌、真菌和非目的放线菌的抑制剂。高选择性分离小双孢菌的程序(Hayakawa, 1991)为:土样自然风干,研细 $\rightarrow$ 100℃干热处理 15min $\rightarrow$ 制备土壤悬浮液(10^{-1}) $\rightarrow$ 1.5%苯酚+0.03%葡糖酸氯己啶 30℃处理 15min(10^{-2}) $\rightarrow$ (10^{-3} , 0.1mL)涂布平板(HV琼脂+萘啶酮酸 20mg/L)。高选择分离小四孢菌的程序为:土样自然风干 $\rightarrow$ 110℃干热预处理 1h $\rightarrow$ 制备土壤悬浮液(10^{-1}) $\rightarrow$ 0.05%芐素氯铵 30℃处理 30min $\rightarrow$ (10^{-2} , 0.2mL)涂布平板(LSV-SE琼脂+卡那霉素 20mg/L+诺氟沙星 20mg/L+萘啶酮酸 10mg/L)。高选择分离马杜拉放线菌的程序(Atha, 1981):土样风干 $\rightarrow$ 100℃干热处理 15min $\rightarrow$ 制备土壤悬浮液(10^{-1}) $\rightarrow$ (10^{-3} , 0.1mL)涂布平板(葡萄糖酵母浸膏琼脂+放线酮 100mg/L+利福平 5mg/L)。另外, Suzuki (2000)也建立了一种高选择性分离马杜拉放线菌(*Actinomadura*)的方法,即干热-HMG-萘啶酮酸法。具体程序为:土样风干 $\rightarrow$ 120℃干热处理 60min $\rightarrow$ 制备土壤悬浮液(10^{-1}) $\rightarrow$ (10^{-3} , 0.1ml)涂布平板(HMG琼脂+萘啶酮酸 10mg/L+甲氧苄啶 50mg/L)。HMG培养基(1L)组成:腐殖酸 0.5g, 3-(N-吗啉代)丙烷磺酸 1g, CaCl_2 0.33g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1mg, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mg, 胞外多糖胶 7g, pH 为 7.2。添加的抑制剂有:硫酸庆大霉素 100mg/L, 氨苄西林钠 20mg/L, 萘啶酮酸 10mg/L, 甲氧苄啶 50mg/L。高选择性分离双孢放线菌(*Actinobispora*)的方法(Suzuki, 1998):土样自然风干 $\rightarrow$ 制备土壤悬浮液(10^{-1}) $\rightarrow$ (10^{-3} , 0.1mL)涂布平板(HVG+制霉菌素 50mg/L+放线酮 50mg/L)。

六、其他分离处理方法

Palleroni (1983)利用游动孢子囊,特别是游动放线菌属(*Actinoplanes*)的孢子囊能被 Cl^- 和 Br^- 吸引的特性,加入 KCl 缓冲液,选择分离得到该属放线菌。Hayakawa (2008)报道了通过添加木糖、氯化物、溴化物、 γ -三甲基吡啶以及香草醛等趋化物分离得到包括游动放线菌属、指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)及短链游动菌属(*Catenuloplanes*)在内的可以形成游动孢子的稀有放线菌;Hong 等(2009)通过氯胺处理可以分离草孢菌属(*Herbidospora*)、小双孢菌属(*Microbispora*)、小四孢菌属(*Microtetraspora*)和链孢囊菌属(*Streptosporangium*)等稀有放线菌时。Hayakawa 等人采用再水化-离心法,分离稀有放线菌,其中以游动放线菌和指孢囊菌为主。在不同样品中也能分离到放线动孢菌(*Actinokineospora*),短链游动菌和动孢囊菌。再水化-离心法操作程序是:取 500mg 风干磨细土壤于锥形瓶中 $\rightarrow$ 用 50mL 含 10%

土壤提取液 10mmol/L 磷酸盐缓冲液轻轻润洗→铝箔覆盖, 30℃ 温育 90min→取 8mL 润洗液, 1500 × g 离心 20min→静置 30min→0.2mL 涂布 HV 琼脂(含三甲氧苄二氢嘧啶 20mg/L, 萘啶酮酸 10mg/L, 放线酮 50mg/L)。HVA 培养基(1L)组成: 腐殖酸 0.1g, CaCO₃ 0.02g, Na₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, KCl 1.7g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01g, 核黄素 0.5mg, 硫胺素 0.5mg, 维生素 B₆ 0.5mg, 烟酸 0.5mg, 肌醇 0.5mg, 泛酸 0.5mg, 生物素 0.25mg, 对 - 氨基苯甲酸 0.5mg, 琼脂 18g, pH 7.2。Karwowski (1986) 等人曾根据放线菌孢子浮力密度的差异, 利用氯化铯密度梯度超速离心有效地从土壤中分离小单孢菌(*Micromonospora*)。Yamamura 等人(2003)根据这一特性, 运用蔗糖梯度离心选择性地分离诺卡氏菌(*Nocardia*), 也取得了成功。应用极高频辐射法(EHF)能抑制一些原核生物, 藻类和单细胞微生物的生长, 促进某些异养和光合微生物的生长及休眠菌株的复苏。为此, Li 等(2002)研究发现 3.8 ~ 5.8mm 和 8 ~ 11.5mm 波长连续处理后, 稀有放线菌的比例从原来的 4.1% 分别升至 8.4% 和 30.6%。其中马杜拉菌(*Actinomadura*)、小四孢菌(*Microtetraspora*)和野村菌(*Nonomurae*)的绝对数量大为提高, 拟无枝酸菌和拟诺卡氏菌(*Nocardiopsis*)也被分离到。EHF 过程: 取 100mg 磨碎混匀的土样悬浮于 10mL 无菌水中, 用频率为 1kHz 的 EHF 照射盛有土壤悬液的试管或平皿底部。处理方式有两种: 一种是以 5.6mm 或 7.1mm 单一波长处理; 另一种是以 3.8 ~ 5.8mm 或 8 ~ 11.5mm 波长连续处理。处理后两种土样都涂布于 Gauze 琼脂(含萘啶酮酸 10mg/L, 制霉菌素 50mg/L)。

七、植物内生放线菌的分离方法

植物内生菌(*Endophytes*)是指在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织内部或细胞间隙、不引起植物产生明显病症的微生物(Bacon, 2000)。植物与其内生菌构成了稳定的共生关系。在植物与内生菌长期的协同进化中, 建立了独特的遗传与代谢关系。由于植物与内生菌相互间基因交换, 使得内生菌具有产生某些与植物相同或相似化合物的能力, 因此, 可作为天然活性物质的重要来源。目前已经有大量植物内生放线菌被分离获得, 如弗兰克氏菌属(*Frankia*)、链霉菌(*Streptomyces*)、小双孢菌属(*Microbispora*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、链孢囊菌属(*Streptosporangium*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、糖霉菌属(*Glycomyces*)、马杜拉菌属(*Actinomadura*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、黄球菌属(*Luteococcus*)及小月菌属(*Microlunatus*)、两面神菌属(*Janibacter*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、微球菌属(*Micrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、野村菌属(*Nonomuria*)、动孢菌属(*Kineosporia*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)等菌株。根据

Strobel(2003)的统计,近来发现的新的生物活性物质有51%分离自内生菌的新物种,而仅有38%来自土壤微生物。从植物内生放线菌已经分离到多种新抗生素,可以杀灭多种引起人体、动物及植物病害的细菌、真菌、病毒和原生动物。内生放线菌还可用于控制植物病害,具有很好的开发潜力。

目前,最容易分离到的内生菌是真菌和细菌。由于放线菌的生长较慢,分离比较困难,必须用特殊的具有高度选择性的分离条件才能分离到(陈华红,2006)。在内生放线菌的分离中,应尽量抑制真菌和细菌的生长,同时又要尽可能避免影响内生放线菌的生长,因此选择性分离培养基的设计极为重要。为此,建议使用无菌水、乙醇和次氯酸钠进行表面消毒。乙醇的浓度在75%~99%,而次氯酸钠的有效氯含量通常为1%~10%;当然,也可以采用适量的升汞和甲醛作为表面消毒剂。另外,减少培养基中有机物的含量也是一个不错的选择,植物组织内部营养并不是很丰富,使用贫营养的培养基可以有效地抑制内生真菌和细菌的生长,对放线菌的生长比较有利(Coombs,2003)。有时在培养基中添加适宜的抑制剂(如真菌抑制剂:放线菌酮、制霉菌素、苯菌灵和重铬酸钾或细菌抑制剂:萘啶酮酸、青霉素等)也可有效抑制细菌和真菌的生长,达到高效分离放线菌的目的。

张金丽等(2013)以美登木(*Maytenus austroyunnanensis*)、哥纳香(*Goniiothalamus yunnanensis*)、露水草(*Cyanotis arachnoidea*)、土党参(*Campanumoea javanica*)、金粟兰(*Chloranthus spicatus*)、木麻黄(*Casuarina naequisetifolia* L.)为材料,比较了不同消毒剂和消毒程序、样品预处理、选择性分离培养基等分离内生放线菌的效果,建议如下方法分离植物内生放线菌效果较好。

(1)选用0.01%吐温20处理30s→有效氯含量为5%的次氯酸钠处理4~7min(根、茎、叶处理时间不同)→无菌水清洗多次→无菌2.5%硫代硫酸钠处理10min→75%乙醇处理5min→无菌水清洗多次→无菌5%~10%碳酸氢钠处理10min。分步处理的程序,能确保植物样品表面消毒彻底,没有外源菌污染。

(2)采用高温、冷冻、液氮研磨、抑制剂浸泡处理的方式对植物样品进行预处理,能显著抑制细菌和真菌的生长,有利于释放植物组织中的放线菌,提高内生放线菌的出菌率。

(3)冷冻处理程序对部分样本效果较好,对其他植物效果不具备普遍性,仅适合少量样品的预处理;高温处理程序效果具有普遍性,适用于绝大部分植物的预处理。

(4)以丙酸盐等小分子有机酸和柠檬酸盐、琥珀酸盐等三羧酸循环的中间产物作为碳源的培养基对内生放线菌的分离效果较好;由于内生真菌、细菌在有机碳、氮源含量较高的培养基上生长较旺盛,不利于内生放线菌的生长;土壤放线菌分离中所使用的经典培养基,如腐殖酸培养基和几丁质培养基等均适合于分离内生放线菌。

八、嗜盐放线菌的分离方法

影响嗜盐放线菌挖掘的影响因素很多,唐蜀昆(2007)等对嗜盐放线菌的分离方法做了总结,认为不同的盐浓度、温度分离得到的放线菌是显著不同的。5% NaCl (m/V) [对于溶质为固体的一般溶液,过去习惯用质量体积百分浓度 (m/V) 表示。因该表示方法是生物学中的常用单位表示方法,故本书仍使用这种单位表示方法。] 分离到的大多是耐盐链霉菌 (*Streptomyces*) 类群,少数是耐盐诺卡氏菌 (*Nocardia*)、小单孢菌 (*Micromonospora*)、原小单孢菌 (*Promicromonospora*)、类诺卡氏菌 (*Nocardioides*) 等类群,很少能分离到嗜盐放线菌。10% NaCl 分离的菌株,大多数也是耐盐放线菌,以类诺卡氏菌占优势,还有少量链霉菌,也能分离到少量的嗜盐拟诺卡氏菌 (*Nocardiopsis*)、糖单孢菌 (*Saccharomonospora*); 15% 或以上 NaCl 分离到的多数菌株为嗜盐放线菌,而且种类丰富,主要类群有多孢放线菌 (*Actinopolyspora*)、糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*)、糖多孢菌 (*Saccharopolyspora*)、链单孢菌 (*Streptomonospora*) 以及少数普氏菌 (*Prauserella*) 类群等。另外,28℃ 分离到的嗜盐放线菌,以拟诺卡氏菌 (*Nocardiopsis*) 为主要类群,还有部分链单孢菌 (*Streptomonospora*)、普氏菌 (*Prauserella*) 等类群; 37℃ 分离到的嗜盐放线菌,以糖单孢菌 (*Saccharomonospora*)、多孢放线菌 (*Actinopolyspora*) 为主,也能分离到部分链单孢菌 (*Streptomonospora*) 和糖单孢菌 (*Saccharopolyspora*) 等类群。

嗜盐放线菌的分离不是简单的用普通的培养基加 NaCl 就能实现的。唐蜀昆等(2007)在前人的基础上,结合长期的嗜盐放线菌分离的经验,推荐了以下适宜盐环境嗜盐放线菌的分离培养基,供参考使用。

(1) 改良 ISP5 培养基 酵母膏 5g, L-门冬酰胺 1g, 甘油 10g, K_2HPO_4 1g, KNO_3 5g, 微量盐 1mL, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 200g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1L。可选择性分离嗜盐或耐盐拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) 类群及放线细菌 (*Actinobacteria*)。

(2) 淀粉酪素培养基 淀粉 10g, 水解酪素 0.3g, KNO_3 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g, K_2HPO_4 2g, $CaCO_3$ 0.02g, $FeSO_4$ 10mg, NaCl 150g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1L。可分离嗜盐或耐盐拟诺卡氏菌 (*Nocardiopsis*) 类群及嗜盐链单孢菌 (*Streptomonospora*)。

(3) 改良淀粉酪素培养基 葡萄糖 10g, 水解酪素 0.3g, KNO_3 2g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g, K_2HPO_4 2g, $CaCl_2$ 1g, $FeSO_4$ 10mg, 不同比例的复合盐 150g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1L。可高选择性分离链单孢菌 (*Saccharomonospora*)、多孢放线菌 (*Actinopolyspora*)、链孢囊菌属 (*Streptomonospora*)、糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*) 等类群, 出菌率达 90% 以上。

九、嗜酸放线菌的分离方法

嗜酸放线菌可分为两大类群,即中度嗜酸 (Neutrotolerant acidophilic) 和严格嗜酸 (Strictly acidophilic) 放线菌 (Seong, 1993; Kim, 2004; Xu, 2006), 广泛分布于酸性

土壤中。中度嗜酸放线菌可在 pH 3.5 或 4.5 至中性生长,而严格嗜酸放线菌的生长 pH 范围为 3.5 ~ 6.5,且利用碳源的能力普遍比中度嗜酸放线菌强;它们的最适生长 pH 范围均为 4.5 ~ 5.5。澳大利亚 Janssen 教授实验室用贫营养的酸性培养基从当地牧场土壤中分离到若干新的嗜酸放线菌,并且用固体培养基比液体稀释培养能更有效地从土壤中分离出多样性的菌株(Sait, 2002; Joseph, 2003; Schoenborn, 2004)。崔庆锋等(2004)从江西、云南、北京采集的 10 份酸性土样进行研究,确立了一种嗜酸稀有放线菌的分离方法。即采用燕麦培养基,每升含燕麦粉 20g,微量盐溶液 0.1% (V/V),琼脂 20g, pH 为 4.5。土壤风干, 120℃ 干热 1h 后采用分散和差速离心法,用 pH 为 4.5 的选择分离培养基(Hasegawa, 1983)进行培养 2 周。丁芸等(2009)对从江西采集的 17 份酸性土壤样品进行嗜酸放线菌的分离研究,确立了最佳嗜酸丝状放线菌的分离方法:土壤样品经分散差速离心预处理后,涂布添加了放线菌酮、制霉菌素和萘啶酮酸(各 50mg/L)的 GTV 培养基(Busti, 2006)。结果表明,6.6% 为严格嗜酸放线菌,72.4% 为中度嗜酸放线菌,21.0% 为耐酸放线菌。嗜酸放线菌比较丰富,代表菌株分布于放线菌目中的 12 个属,即链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、野村菌属(*Nonomuraea*)、韩国生工属(*Kribbella*)、小双孢菌属(*Microbispora*)、马杜拉菌属(*Actinomadura*)、拟无枝菌酸菌属(*Amycolatopsis*)、指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)、伦茨氏菌属(*Lentzea*)、游动四孢菌属(*Planotetraspora*)和链嗜酸菌属(*Streptacidiphilus*)。

毫无疑问,为了获得更多的放线菌资源,研究者不断探索新的分离方法,如噬菌体选择性分离技术,孢子诱导分离技术等;同时也在不断地探索新的环境放线菌的分离手段,如海洋放线菌的分离方法、嗜碱放线菌的分离方法、动物粪便中的放线菌分离以及温泉环境放线菌的分离等,并获得了大量新的放线菌新物种。总之,分离技术需要不断探索,才能更好地呈现多彩的放线菌世界。

第二节 罗布泊盐湖可培养放线菌多样性

新疆地域辽阔,盐湖星罗棋布,气候干燥,自然地理环境独特,是我国范围最大的干旱—半干旱盐湖成盐区。新疆具有 112 个(面积大于 1km²)盐湖,其中罗布泊是新疆最大的干盐湖。最大时湖泊面积达 5200km²,1931 年测得面积为 1900km²,1962 年航测仍有 660km²。由于气候变暖和人类活动的不断加剧,导致湖水萎缩、植被退化、区域生态严重恶化。1972 年的卫星照片反映出罗布泊已完全干涸,成为广袤的干盐滩,寸草不生,人迹罕至,成了地球的“旱极”。“耳纹”状的轮廓如图 2-2 所示。这个曾人口众多、繁华兴盛的古代楼兰王国,是闻名中外的丝绸之路的咽喉门户,现在只剩一圈圈盐壳组成的荒漠。

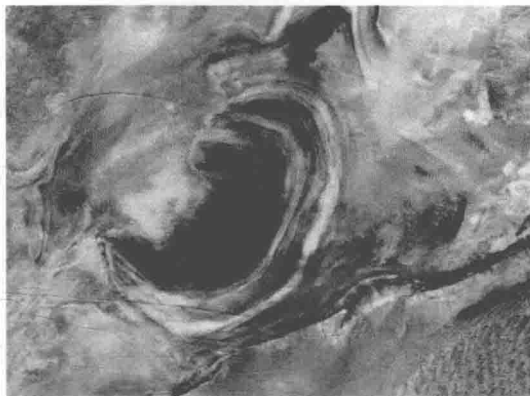


图 2-2 罗布泊“耳纹”

罗布泊是一个封闭性的干盐湖,位于新疆巴音郭楞蒙古自治州若羌县东北部罗布泊镇($90^{\circ}09'35''-92^{\circ}10'30''\text{E}$, $39^{\circ}45'10''-40^{\circ}45'40''\text{N}$),海拔 780m,是塔里木盆地中的塔里木河、孔雀河、车尔臣河等的归宿地。该地区年平均降水量为 22.2mm,蒸发量为 2902.2mm,冬季极端最低气温 -33°C ,夏季极端最高气温 45°C ,地表温度达到 71°C ,属于极端干旱荒漠气候(赵元杰,2006)。据 1997 年中国科学院盐湖研究所取样分析,罗布泊湖表层晶间卤水矿化度 372.084g/L, pH 为 7.23,湖水化学类型为硫酸盐型硫酸镁亚型。其盐湖盐类矿物组成主要有碳酸盐、硫酸盐、硝酸盐和氯化物盐类。罗布泊湖盆为新生代构造坳陷盆地,盆内为第四纪冲积、风积和湖积沙砾石、粉细沙、粉沙黏土及钙钠硫酸盐岩系和钠钙氯化物、硫酸盐类化学沉积覆盖。经过地质和年代更替演化,形成了近代著名的雅丹地貌,湖表出现富钾含膏的坚硬石盐盐壳(刘成林,2006)。

在人与自然这一复杂的巨大的系统中,湖泊是地球表层系统各圈层相互作用的联结点,具有调节区域气候、记录区域环境变化、维持区域生态系统平衡和繁衍生物多样性的特殊功能,也是人类赖以生存的重要场所。自 20 世纪 50 年代以来,我国湖泊在自然和人为活动双重胁迫的共同作用下,其功能发生了剧烈的变化,总体趋势是湖泊在大面积的萎缩甚至消失,储水量骤减,湖泊水质不断恶化,湖泊生态系统严重退化,给区域经济和社会可持续发展带来严重威胁。

新疆罗布泊地理环境独特,生态环境独一无二。盐湖处于极端干旱、高温、高盐、贫瘠的荒漠生态环境,是极端嗜盐微生物生存的天然温床,也是挖掘嗜盐放线菌物种的理想之地。然而,随着罗布泊盐湖的干涸,很多独特的物种和基因资源必将随着生态环境的巨大变化也随之消失。利用是最好的保护!利用之前,物种资源又是必不可少的前提。因此,罗布泊盐湖嗜盐微生物物种资源亟待挖掘。这不仅有利于解决极端微生物资源匮乏的实际问题,还将对生命科学的发展提供全新的强有

力的材料支撑。极端环境微生物凭借其对极端环境条件适应的独特性而成为生物技术创新的源泉之一。它不仅为人类提供了解决环境、能源和人口健康等重大关键问题的新思路、新途径,也将为发展高新生物技术产业提供了特殊的新材料资源。

一、材料与方法

(一) 样品采集

2007 年 10 月 12 日,从新疆若羌县进入罗布泊镇,路上道路交通不便,手机无信号,需要携带卫星电话。为了安全起见,需要 2 车同行,可备带饮食和汽油等。罗布泊干盐湖沉积物样品采集深度 0~40cm,采集点无植被,可谓天上不见一只飞鸟,地上不见一棵草,环境极端恶劣。由于罗布泊大多数地方都是厚厚的干盐壳,如图 2-3 所示,需要携带较好的挖掘工具。样品 pH 检测为 6.5~8.0,样品采集后装入无菌收集瓶中,4℃ 车载小型冰箱保存。以上过程均严格无菌操作。其中 3 份样品(编号 L₁、L₂、L₃)信息如表 2-1 所示,被用做可培养分析。

表 2-1 罗布泊样品信息

编号	土壤类型	深度/cm	海拔/m	N	E	pH
L ₁	沙土	0~40	785	39°41'979"	89°54'496"	8.0
L ₂	壤土	0~40	776	40°14'161"	90°16'712"	7.0
L ₃	沙土	0~40	777	40°30'784"	90°18'418"	6.5

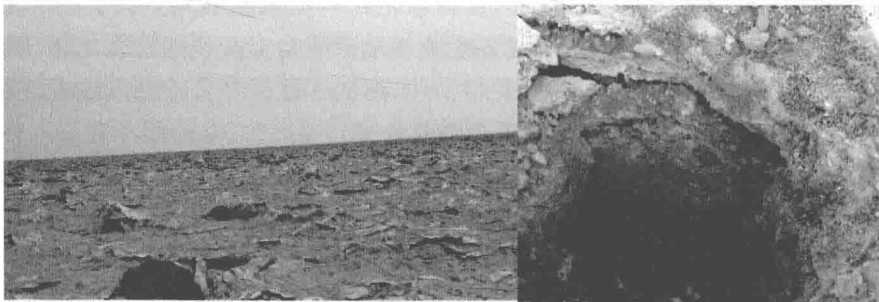


图 2-3 罗布泊干盐湖

(二) 盐湖沉积物样品离子成分检测

为了认识采集的罗布泊干盐湖沉积物样品,从而便于分离培养基的设计,抽取 3 份土壤样品(编号 L₁、L₂、L₃)用于检测该环境样品的可溶性总盐的含量以及其中各种盐离子成分。样品的盐离子组分的测定采用《土壤农化分析》(鲍士旦,2000)中描述的方法。比如可溶性总盐的测定采用残渣烘干法,Cl⁻ 含量用硝酸银滴定法,SO₄²⁻、Mg²⁺ 和 Ca²⁺ 含量用 EDTA 滴定法,K⁺ 和 Na⁺ 用火焰光度法等。

(三) 分离培养基

为了更好地分离样品中的放线菌物种,我们结合样品的生态环境、离子成分、嗜盐菌的嗜盐生理以及前人使用的培养基等因素,改良和设计了以下9种培养基,用于分离罗布泊盐湖土壤样品。同时,以高氏一号琼脂培养基和HV琼脂培养基(Hayakawa,2008)为对照。

1. 高氏一号琼脂培养基(Gause No. 1)

可溶性淀粉 20g,硝酸钾 1g,磷酸氢二钾 0.5g,硫酸镁 0.5g,硫酸铁 0.01g。

2. HV 琼脂培养基

3. GW1 琼脂培养基

酪蛋白酸水解产物 0.3g,甘露醇 1g,碳酸氢钠 2g,碳酸钙 0.2g,硫酸铵 2g,硝酸钾 2g,磷酸氢二钾 1g,硫酸镁 2g,硫酸铁 0.02g/L,痕量盐 10mg/L。

4. GFA(P5) 琼脂培养基

甘油 5g,岩藻糖 5g,天门冬酰胺 0.5g,硝酸钾 1g,氯化钾 3g,磷酸氢二钾 1g,氯化钠 2g,氯化镁 5g,氯化锰 0.02g/L,硫酸锌 0.07g/L,硫酸铁 0.02g/L,维生素 B₁ 0.2mg,肌醇 0.5mg,维生素 C 0.2mg。

5. AGG 培养基

L-天冬酰胺 0.5g,葡萄糖 1g,甘油 1g,磷酸氢二钾 0.3g,硫酸镁 0.2g,氯化钠 0.5g。

6. MM 琼脂培养基

葡萄糖 0.5g,酵母浸出粉 0.5g,磷酸氢二钾 0.3g,氯化钠 0.5g,硫酸镁 1g,碳酸钙 0.1g,氯化锰 0.02g,硫酸锌 0.07g,硫酸亚铁 0.01g。

7. GL3 琼脂培养基

微晶纤维素 5g,酪蛋白酸水解产物 0.3g,精氨酸 0.5g,氯化钾 5g,硝酸钾 0.5g,磷酸氢二钾 0.2g,碳酸钙 0.02g,硫酸镁 2g,硫酸亚铁 0.01g。

8. 307M 琼脂培养基

酵母浸出粉(Difco)2g,酪蛋白氨基酸(Difco)2g,谷氨酸钠 1g,柠檬酸三钠 3g,硫酸镁 10g,氯化钙 2g,氯化钾 5g,氯化亚铁 0.5mg,氯化锰 0.5mg。

以上所有培养基使用琼脂粉 18~20g,并补水至 1L,调整 pH 为 7.0~7.5。为获得不同盐浓度下的放线菌,我们采用上述 12 种培养基,用不同盐浓度梯度(原培养基、补充 5%、10%、15%、20% 的 NaCl)进行样品的分离。

(四) 样品的分离

无菌操作条件下,直接选取采集的新鲜样品 1g,放于 100mL 生理盐水中,加入玻璃珠,在 37℃ 恒温 200 r/min 摇床过夜,制成 10^{-2} 悬浊液。吸取 0.1mL 悬浊液,均匀涂布于预先配制好的固体培养平板上,37℃ 倒置保湿培养,减少培养基水分散失,延长培养时间。