文章编号: 1008-1542(2005)03-0215-04

河北省粘细菌物种资源多样性的研究
——承德市区及其五县生态样品的研究

李艳青, 张利平, 杨润蕾

(河北大学生命科学学院, 河北保定 071002)

摘 要: 采用本室创立或改进的粘细菌分离纯化方法, 对采自承德不同地区的 372 份土壤或其他生态样品中的粘细菌进行了分离纯化和初步鉴定, 按不同地点、样品性质和生态环境进行了种群分布及多样性的统计分析。从所采集的样品中, 共分离得到 7 个属(*Archangium*, *Myxococcus*, *Cystobacter*, *Corallococcus*, *Melittangium*, *Stigmatella*, *Nannocystis*)的 300 余株粘细菌。分析结果表明, 承德地区粘细菌在营养丰富的样品中分布数量多, 种群多样性好; 野外地区样品的粘细菌数量及种群多样性较市区样品具有明显优势; 样品性质和分离方法在粘细菌种属多样性的分析中也有重要的影响。

关键词: 粘细菌; 种群分布; 生态环境; 资源多样性; 分菌率

中图分类号: Q938.1 文献标识码: A

Study on diversity of species resource of myxobacteria in Hebei province: urban district and five counties of Chengde

LI Yan-qing, ZHANG Li-ping, YANG Run-lei

(College of Life Science, Hebei University, Baoding Hebei 071002, China)

Abstract: With isolation methods designed or improved by our laboratory, more than 300 strains of 7 genera, *Archangium*, *Myxococcus*, *Cystobacter*, *Corallococcus*, *Melittangium*, *Stigmatella* and *Nannocystis* of myxococcales were isolated from 372 samples in some areas of Chengde. Analysis of the samples of shows that isolated myxobacteria have a large quantity and a good diversity of species in nutritious earth different locations, characters and environment. And the mycobacteria in wild samples are ascendent in quantity and diversity than in incity samples. The sample characters and isolation methods play important roles in the study on diversity of species of myxobacteria.

Key words: myxobacteria; population distribution; environment; diversity; ratio of isolation

粘细菌在分类学上被作为粘球菌目(Myxococcales), 主要特征包括: 营养细胞成杆状, 革兰氏染色阴性, 滑行运动, 产生子实体和抗逆性强的粘孢子[1]。粘细菌可产生异常丰富的次级代谢产物, 在微生物新药的开发研究中是优良的菌种资源。特别是 20 世纪 90 年代德国学者发现由粘细菌产生的高效抗肿瘤抗生素环氧噻酮(epothilones)以来, 粘细菌开始展现其重要的应用价值[2]。

随着人们对微生物多样性及微生物资源重要性的认识日益加强, 粘细菌生态分布及其多样性的研究也在全球范围内得到了广泛的关注。DAWID 采集了全球 64 个国家的 1 398 份土样, 对粘细菌的全球生态分

收稿日期: 2005-04-08; 修回日期: 2005-05-16; 责任编辑: 陈玉堂

作者简介: 李艳青(1980-), 女, 河北满城人, 硕士研究生, 主要从事微生物分类方面的研究。

通讯作者: 张利平(E-mail: Zhlping@mail.hbu.edu.cn)

布进行了较为系统的分析研究,为粘细菌的研究开发及资源保护工作作出了贡献[3]。

中国有关粘细菌的研究工作报道不多,近年来方晓梅、张利平[4]等在粘细菌生态分布及多样性分析方面进行了探索。本文报告了对河北省粘细菌资源的部分调查研究结果,以期在粘细菌的分离纯化、基础分类以及生态分布状况等方面积累数据资料,为今后粘细菌的进一步研究开发提供参考。

1 材料和方法

1.1 样品来源

采自避暑山庄、承德市区及宽城县、平泉县、兴隆县、承德县及滦平县不同生态环境的样品372份。

1.2 培养基

WCX培养基:$w(CaCl_2 \cdot 2H_2O)$为0.1%;w(琼脂)为1.5%;pH值为7.2。灭菌后加入终质量浓度为25 μg/mL的无菌放线菌酮。待培养基冷凝后在其表面用灭活的酵母划线。

CAS培养基:w(酶解酪素)为1%;$w(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$为0.1%;pH值为7.2。

VY/2培养基:w(酵母)为0.5%;$w(CaCl_2 \cdot 2H_2O)$为0.1%;pH值为7.2。灭菌后加入终质量浓度为25 μg/mL的VB_{12}。

IXCS培养基:$w(KNO_3)$为0.1%;$w(FeCl_3 \cdot 6H_2O)$为0.02%;$w(K_2HPO_4)$为0.1%;$w(MnSO_4 \cdot H_2O)$为0.01%;$w(CaCl_2 \cdot 2H_2O)$为0.1%;$w(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$为0.1%;w(酶解酪素)为0.002%;w(琼脂)为1.5%;pH值为7.2。灭菌后加入终质量浓度为25 μg/mL的无菌放线菌酮。

兔粪培养基:采集无污染的兔粪,高压蒸气灭菌。

1.3 样品中目的菌的分离

将所采集样品在室温下自然风干,采用ZHANG L等人[5]在REICHENBACH和DAWID的分离方法[3,6]基础上改良的兔粪诱导法分离粘细菌。

自土壤样品中分离粘细菌:称取20 g风干的样品,加入制霉菌素粉末和无菌水,使其成糊状。倒入平皿,将2~3粒灭菌兔粪置于其中。于30 ℃恒温培养箱中培养5~7 d。

自树皮及腐木样品中分离粘细菌:称取5 g,样品浸入80 μg/mL的放线菌酮溶液过夜,将样品转移至浸有IXCS培养基的滤纸上,置于30 ℃恒温培养箱中培养7~10 d。

1.4 目的菌的纯化

采用ZHANG L等创立的生态纯化法[5]对目的菌株进行快速纯化。

1.5 目的菌的纯度检验和富集培养

按照方晓梅、张利平创建的纯度检验和富集培养同步实验的方法[4],将纯化后的目的菌接种于CAS培养基中,30 ℃震荡培养。2 d后培养液澄清即表明目的菌为纯菌株,继续培养5 d后可获得大量菌体。

1.6 目的菌的分类鉴定

根据《Bergey's manual of determinative bacteriology》第9版[1]的粘细菌分类标准,以形态特征为主,生理生化特征为辅的鉴定原则,将分离出的菌株进行初步鉴定。根据分离物的营养细胞、粘孢子和子实体的形态特征进行初步的分类鉴定。

1.7 目的菌的保藏

采用VY/2斜面培养基对粘细菌分离物进行保存。其方法如下:将菌体接种于VY/2斜面培养基上,培养3~4 d,待长出子实体或特征性菌落后,密封置于20 ℃恒温保存。

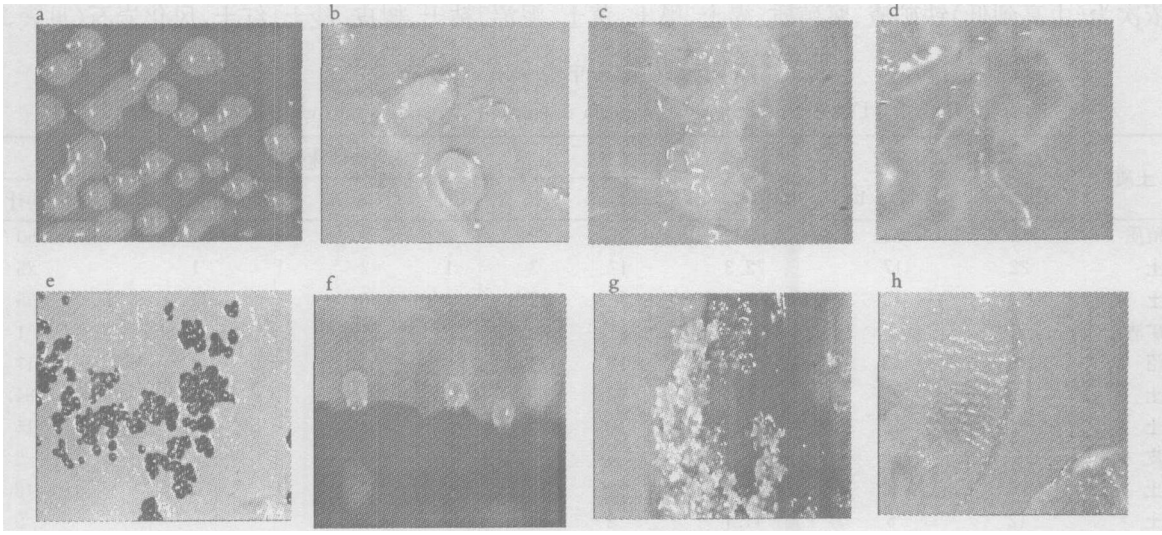
2 结果与讨论

本实验以采自承德地区不同生态环境的372份土壤样品为材料进行了粘细菌物种分布的研究,从372份土壤样品中分离得到了粘细菌的分离物307株。

2.1 样品中目的菌的菌属总量

经分析鉴定从样品中所分离到的粘细菌属有以下几个种属,它们所形成的子实体的形态特征见图1。

粘球菌属(*Myxococcus*,以下简写为Mx.,下同)223株,原囊菌属(*Archangium*,Ar.)27株,珊瑚球菌属(*Corallococcus*,Cc.)9株,孢囊杆菌属(*Cystobacter*,Cb.)35株,蜂窝囊菌属(*Melittangium*,M.)5株,侏囊



a. Mx. Strain91102 on WCX, 25×; b. Mx. Strain91201 on WCX, 25×; c. Ar. Strain 91092 on WCX, 24×;
d. Cc. Strain 91087 9n WCX, 50×; e. Cb. Strain 91172 on WCX, 50×; f. M. Strain 91081 on rabbit feces, 25×;
g. Sg. Strain 91033 on WCX, 12×; h. Na. Strain 91213 on WCX, 6×

图 1　几种粘细菌在不同培养基上生长的子实体形态特征

Fig. 1　Morphological features of fruit bodies of some myxobacteria on various media

菌属(*Nannocystis*, Na.) 2 株, 标桩菌属(*Stigmatella*, Sg.) 6 株。

伯杰氏手册中所记录的另外 5 个属的粘细菌类群在我们的样品中没有分离到, 它们是 *Angiococcus*, *Chondromyces*, *Haploangium*, *Polyangium*, *Sorangium*。

2.2　不同区域样品中粘细菌的分布状况

在避暑山庄、承德市区、兴隆县、滦平县、宽城县、平泉县、承德县等 7 个区域中, 粘细菌的分菌率最高的是平泉县, 承德县、兴隆县、宽城县和避暑山庄居中, 承德市区和滦平县较低(见表 1)。

表 1　不同地区样品中粘细菌的分布状况

Tab. 1　Distribution of myxobacteria in samples of different regions

区　域	样　品	出　菌	样品出	分离物菌株数目/株							
	总数/份	样品数/份	菌率/%	Mx.	Ar.	Cc.	Cb.	M.	Sg.	Na.	共计
避暑山庄	18	11	61.1	10	0	2	0	2	0	0	14
承德市区	12	7	58.3	6	0	0	2	0	1	0	9
兴隆县	72	47	65.3	42	10	1	6	2	0	0	61
滦平县	100	55	55.0	45	6	2	13	0	3	0	69
宽城县	61	39	63.9	41	2	2	3	0	2	0	50
平泉县	54	42	80.8	40	8	1	7	1	0	1	58
承德县	55	39	70.9	39	1	1	4	0	0	1	46
共　计	372	240	64.5	223	27	9	35	5	6	2	307

由此看出, 承德地区的粘细菌资源与其他地区[4]相比稍差, 样品平均分菌率为 64.5%; 粘细菌多样性与其他相关文献[3]记录相比处于中等水平。分析原因主要是因为承德地区地处中国北部, 属温带大陆性干旱季风气候, 地形以山脉和丘陵为主, 这使得该地区为微生物提供的生存环境较为有限。

同时还可以看出, 在人类活动较为频繁的区域, 如承德市区, 分菌率较低、多样性较差, 说明人类活动使原始粘细菌资源受到破坏。

另外, 表 1 结果还表明所分析的承德地区样品中粘球菌(*Myxococcus*)数量要明显高于其他菌属, 但常规的粘细菌分离方法对于粘球菌属较为有效也是造成该结果的原因之一, 因此对于其他菌属的高效分离方法还应进一步改进。

2.3　不同性质样品中粘细菌的分布情况

将采集的样品根据其性质分为 11 大类, 每种类型样品均分离到若干种粘细菌。根据分菌率的高低排列

顺序依次为(由高到低)铁矿渣、腐殖质、褐土、黑土、黄土、泥沼、粘土、树皮、沙土、红土、风化岩石(见表 2)。

表 2 不同性质样品中粘细菌的分布情况

Tab. 2 Distribution of myxobacteria in samples with different characters

土质	样品总数/份	出菌样品数/份	样品出菌率/%	分离物菌株数目/株							
				Mx.	Ar.	Cc.	Cb.	M.	Sg.	Na.	共计
腐殖质	38	33	86.8	38	2	3	4	2	1		50
黑土	22	17	72.3	17	3	1	2	1	1		25
褐土	51	43	84.3	46	2		6		1		55
铁矿渣	1	1	100	1							1
泥沼	19	12	63.2	12	4		1				17
黄土	107	70	65.4	63	9	2	8	1	1		84
粘土	21	12	57.1	10	2		2		1		15
树皮	8	4	50	3						2	5
沙土	85	40	47.1	29	5	2	10	1	1		48
红土	12	5	41.7	3		1	1				5
风化岩石	8	2	25	1			1				2

各种土质中,腐殖质类样品富含多种有机质,能够为微生物提供丰富的营养物质,且其酥松潮湿的性质更有利于粘细菌的生长繁殖,褐土和黑土也是较为肥沃的土壤类型,而沙土、风化岩石与此相反,具有贫营养的性质,黄土、粘土及树皮等样品无论从自身性质还是其中的粘细菌分布都居于中间位置。由此证明粘细菌在营养较丰富的环境中生长较好。

由于铁矿渣样品只有 1 份,故其结果普遍意义较差,但能够说明粘细菌在极端环境下具有超强的生存能力。这一结论在泥沼样品的分析结果中同样得到证明。泥沼属于较为恶劣的生存环境之一,但粘细菌在此环境中的分菌率相对其他环境处于中等水平。

从分离的种群来看,孢囊杆菌属(*Cystobacter*)在沙土样品中分布最广,侏囊菌属(*Nannocystis*)只在树皮样品中分离得到。由此可初步推断,孢囊杆菌属对营养物质的依赖性较小,干燥通风的环境更适应其生长;而侏囊菌属较为合适的生长基质为树皮等植物纤维物质。

2.4 不同植被样品中粘细菌的分布情况

笔者将采集样品的地方按植被归属为 7 个类型:草地、菜园、农田、森林、花园、果树林、灌木丛。就分菌率来说,森林样品居首位,草地、菜园、农田、花园居中,果树林和灌木丛较低。在目的菌种群方面,森林样品中也最为丰富,而菜园和花园样品的种群较少(见表 3)。

同时,笔者还注意到,有植被覆盖的土壤的粘细菌分菌率及种群多样性要高于裸露的土壤,其中,*Melittangium*, *Stigmatella*, *Nannocystis* 3 个属主要分布于有植被覆盖的土壤中。

表 3 不同植被样品中粘细菌的分布情况

Tab. 3 Distribution of myxobacteria in samples with different vegetations

植被类型	样品总数/份	出菌样品数/份	样品出菌率/%	分离物菌株数目/株							
				Mx.	Ar.	Cc.	Cb.	M.	Sg.	Na.	共计
森林	14	14	100	7	2	3		1		2	15
草地	33	29	87.9	27	4			2	1		34
菜园	15	12	80.0	13			1				14
农田	19	15	78.9	10	1		3		2		16
花园	5	3	60.0	3			1		1		4
果树林	14	8	57.1	8			1	1	1		11
灌木丛	16	9	56.3	7	1	2	1				11
无植被	310	150	48.4	148	19	4	28	1	1	0	201

3 结 论

综合以上结果,得出以下结论。

(下转第 224 页)

根据以上分析, 以 ZCuAl8Mn13Zn7FeNiMo 的铜合金为基础, 再添加 B 和 V 合金元素, 对其进行微量合金化, 并采用适当的热处理工艺, 可以达到挖掘材料潜力、提高合金力学性能的目的。

1.2 1-5# 合金的微量合金化

B 和 V 在含铁的铝青铜中具有长效变质的效果[8]。B 在合金的结晶过程中生成 B_4C, 其晶格结构与 β 相很相近, 故 B 能作为 β 相的活性变质剂; 同时 B 的脱氧能力很强, 对净化晶界、减少夹杂物均起到有利的作用。V 能促进 α 相的分解, 形成金属间化合物质点。

由表 1 可知, 编号为 1-5# 的合金, 强度 σ_b 达到 883 MPa, 伸长率 δ 为 18%, 硬度 HB 为 312, 力学性能优秀。以其为基本成分, 添加 B, V 元素, 对合金进行微量合金化, 并对合金进行 760 ℃×1 h, 820 ℃×1 h, 860 ℃×1 h 水淬热处理, 以最大限度地挖掘材料的潜力。检验表明, 经 820 ℃×1 h 水淬热处理的合金, 强度 σ_b 由 883 MPa 提高到 985 MPa, 硬度 HB 由 312 提高到 325, 伸长率 $\delta_5 \geqslant 18\%$。用该合金制造的诸如活扳手、呆板手、錾子、圆头锤等防爆工具, 经防爆模拟试验, 无火花产生, 防爆工具没有出现变形、掉快、断裂等问题。

2 结 论

以 ZCuAl8Mn13Zn7FeNiMo 为基本成分同时添加 B 和 V 微合金化的新型防爆合金, 经 820 ℃×1 h 淬火处理后, σ_b 为 985 MPa, $\delta \geqslant 18\%$。该合金性能稳定, 在强烈冲击和摩擦条件下, 无火花产生。用该合金制造的防爆工具没有出现变形、掉块、断裂等问题。

参考文献:

[1] 王忠民, 李增民. 新型防爆材料的研究及应用[J]. 铸造技术, 2001, (3): 51-53.
[2] 王忠民, 刘群山, 张忠成. 代铍青铜铝镍黄铜的研究[J]. 热加工工艺, 2003, (1): 49-50.
[3] 潘奇汉. 新型铸造铜合金[J]. 铸造, 1991, (11): 1-13.
[4] 陆文华, 李隆盛, 黄良军. 铸造合金及其熔炼[M]. 北京: 机械工业出版社, 1997.
[5] 秦乐天, 武厚军, 常明安. 铝青铜高速螺旋桨熔模铸造工艺[J]. 特种铸造及有色合金, 2002, (1): 30-32.
[6] 纪胜如, 陈 菁, 陈慧敏. 高锰铝青铜合金强韧性的研究[J]. 特种铸造及有色合金, 1998, (4): 44-46.
[7] 牛广田. 耐磨无镍青铜的研究[J]. 特种铸造及有色合金, 1988, (5): 36-37.
[8] 李元元, 郭国文, 张卫文, 等. Zr 和 V 对铝铜合金力学性能的影响[J]. 特种铸造及有色合金, 2002, (3): 4-6.

(上接第 218 页)

1) 营养丰富、生态环境保持较好的地方更适合于粘细菌生存, 其分菌率和种群多样性较好。对于有植被覆盖的土壤, 其粘细菌的数量和种类都明显多于裸露的土壤, 森林土壤则更适于粘细菌生存。

2) 孢囊杆菌属在沙土中分布相对较广, 侏囊菌属均分布在树皮样品中, 可见在粘细菌种群多样性的分析研究中, 样品性质和分离方法起着重要的作用。另一方面粘细菌耐受极端环境的能力极强, 如在铁矿渣、泥沼等样品中已分离得到多个种属的粘细菌。

3) 人类活动对粘细菌资源有不良影响, 市区样品及经人类垦殖的土壤样品, 粘细菌数量和种群多样性明显低于偏远的自然生态环境样品。

参考文献:

[1] JOHN G H, NOEL R K, PETER H S, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. Ninth Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 515-525.
[2] FL RSHEIMER A, ALTMANN K-H. Epothilones and their analogues-a new class of promising microtubule inhibitors[J]. Expert Opin Ther Patents, 2001, 11 (6): 951-968.
[3] DAWID W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24 (4): 403-427.
[4] 方晓梅, 张利平. 粘细菌生态多样性的初步研究[J]. 生物多样性, 2001, 9(3): 207-213.
[5] ZHANG L, WANG H, FANG X, et. al. Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains[J]. Microbiol Methods, 2003, 54(1): 21-27.
[6] REICHENBACH H, DWORKIN M. The myxobacteria[A]. Starr K P, Stolp H, Trper H G, et al. The Prokaryotes[C]. New York: Springer, 1991. Vol. 4: 3 415-3 487.