

阿克苏高盐咸水滩放线菌分离新策略及系统发育多样性

张瑶^{1,2}, 夏占峰^{1,2}, 曹鑫波², 李军², 张利莉^{1,2*}

¹塔里木大学, 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 阿拉尔 843300

²塔里木大学生命科学学院, 阿拉尔 843300

摘要:【目的】探讨高盐咸水滩放线菌的分离新策略, 为高盐地区放线菌资源的分离提供理论依据。【方法】以甘油-精氨酸培养基、海藻糖-肌酸培养基、甘油-天冬氨酸培养基、甘露醇-酸水解酪蛋白培养基、干酪素-甘露醇、甘露醇-丙氨酸培养基、壳聚糖-天冬酰胺培养基和高氏一号琼脂培养基 8 种培养基为基础培养基, 采用营养成分十倍稀释法、据土样理化性质模拟原始生态环境、免培养分子技术检测菌株的分离培养基及培养条件指导放线菌可培养性以及借鉴半咸水海洋环境放线菌分离培养基等 4 种策略来优化设计培养基, 进行阿克苏高盐咸水滩土样放线菌的分离, 并采用细菌通用引物进行 16S rRNA 基因扩增和序列测定, 并构建系统发育树。【结果】共分离到 403 株, 分属于放线菌的 8 个亚目 10 个科, *Streptomyces*、*Streptomonospora*、*Saccharomonospora*、*Plantactinospira*、*Nocardia*、*Amycolatopsis*、*Glycomyces*、*Micromonospora*、*Nocardiopsis*、*Isoptericola*、*Nonomuraea*、*Thermobifida*、*Actinopolyspora* 和 *Actinomadura* 等 14 个属。69.96% 菌株属于链霉菌亚目 (*Streptomycineae*), 9.68% 菌株属于链孢囊菌亚目 (*Streptosporangineae*), 9 株为潜在新种。【结论】4 种分离新策略显著地提高了高盐地区放线菌的可培养性, 还发现了许多新物种, 为放线菌的分离提供了新思路与途径。

关键词:高盐咸水滩, 放线菌, 分离策略, 培养基

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013)08-0798-11

放线菌是一类重要的微生物, 能产生多种有益代谢产物如酶、抗生素等, 具有很高的经济价值。发现新的生物活性代谢产物的有效方法是通过分离新的微生物尤其是产生 70% 的已知生物活性代谢产物的放线菌^[1]。当人们从普通环境中寻找新型活性物质日益困难时, 极端环境成为人们发现新放线菌物种及新生物活性物质的沃土。目前普遍认为, 用一般的分离方法从环境样品中获得的微生物纯培养物重复性非常高, 也很难再分离到新物种, 研究也

发现多数用于普通环境放线菌分离的培养基并不适用于高盐环境放线菌的分离, 这无疑限制了极端环境微生物资源的挖掘。因此, 不断探索有效的微生物分离策略和方法, 从不同角度、不同层次建立分离微生物的新方法就成了微生物工作者一项长期的任务。

阿克苏北靠天山汗腾格里峰, 东望塔里木河, 西界中吉(吉尔吉斯斯坦)边境天山山地, 南邻塔里木盆地, 形成了由沙漠、戈壁、绿洲和高山相互交叉过

基金项目: 国家自然科学基金项目(31060001); 国家“973 项目”前期研究专项(2010CB134505); 国家“863 计划”(2012AA021705)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-997-4681612; E-mail: zhang631lyly@yahoo.com.cn

作者简介: 张瑶(1985-), 女, 山西人, 硕士研究生, 主要从事极端环境放线菌资源方面的研究。E-mail: zhagyao2011shangxi@yahoo.cn

收稿日期: 2013-01-05; 修回日期: 2013-04-01

渡, 罕见而独特的生态环境。阿克苏属暖温带干旱气候区, 降水稀少, 蒸发量大, 气候干燥。干旱的气候造成了大量高盐环境, 如盐山、盐碱地、咸水滩等。由于长期干旱, 水量得不到充足补给, 阿克苏地区部分咸水滩目前极度萎缩, 水域面积迅速变小, 导致湿地植被大量枯死, 一些珍稀物种和鸟类将失去生存和繁衍的环境。多数咸水滩日趋干涸, 一旦此环境改变或消失, 那么所蕴含的放线菌或许会随之减少甚至灭亡, 且目前尚未见到对阿克苏地区咸水滩放线菌资源研究的相关报道, 尤其是含盐量高达 20% 以上的咸水滩更具有代表性, 因此, 其微生物物种的挖掘对微生物资源的保护和利用尤为重要, 也可进一步为盐碱化环境的生态修复、极端环境放线菌基因资源的保护和利用提供理论依据。

免培养技术能够快速全面地调查环境中微生物的多样性, 尤其是能获得难以分离培养的微生物的信息。根据笔者对阿克苏高盐咸水滩环境的放线菌

免培养研究, 发现放线菌物种极为丰富, 还蕴含着不少新的类群。本研究采用免培养分子技术的优势来指导高盐咸水滩放线菌可培养、寡营养、据土样理化性质模拟原始生态环境和借鉴半咸水海洋环境放线菌分离培养基 4 种方法, 进行新疆高盐咸水滩环境放线菌分离策略的探讨, 以期高盐环境放线菌分离提供参考, 同时挖掘更多的放线菌资源。

1 材料和方法

1.1 样品的采集和土样理化参数测定

2011 年 10 月 22 日, 从阿克苏地区高盐咸水滩 (40° 379' E, 80° 154' N) 采集土样, 采样点海拔 1044 m。在咸水滩中心及周围 5 个样点取样, 深度为 0-20 cm。样品采集后于无菌保鲜袋中, 运抵实验室后于 4℃ 和 -20℃ 保存。样品含盐量、主要离子浓度、pH 值等 10 个指标见表 1。

表 1. 阿克苏高盐咸水滩土样理化性质

Table 1. Physical biochemical parameters of the studied soil samples from hypersaline beach of Aksu

Sample	$c(\text{HCO}_3^-)/\%$	$c(\text{SO}_4^{2-})/\%$	$c(\text{CO}_3^{2-})/\%$	$c(\text{Cl}^-)/\%$	$c(\text{Na}^+)/\%$	$c(\text{K}^+)/\%$	$c(\text{Ca}^{2+})/\%$	$c(\text{Mg}^{2+})/\%$	pH	Total salt/%
Hypersaline beach of Aksu	0.0155	1.734	0.005	3.99	0.753	0.09	0.464	0.717	7.97	20.16

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、pMD18-T Vector、*Hae*III 限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自诺维森(北京)生物科技有限公司; 离心机购自德国 Eppendorf 公司; PCR 仪购自德国 SensoQuest 公司、凝胶成像分析系统购自美国 BIO-RAD 公司; 电泳仪购自北京六一仪器厂; 超净工作台购自上海博讯实业有限公司; 涡旋仪购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; 金属浴购自金银杏生物科技(北京)有限公司。

1.3 克隆文库免培养方法

1.3.1 土壤总 DNA 的提取和放线菌特异性序列的扩增: 采用 SDS-CTAB 法^[2] 提取样品总 DNA。提取的总 DNA 用放线菌特异性引物^[3] (S20: 5'-CGCGCCTATCAGCTTGTG-3', A19: 5'-CCGTACTCCCAGCGGGG-3') 进行扩增, 在 640 bp 处有条带。

1.3.2 克隆文库的构建: 按照诺维森(北京)生物科技有限公司 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒说明回收纯化 PCR 扩增目的条带。纯化后的 PCR 产物通

过与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。经蓝白斑筛选, 将白色克隆于 -80℃ 冰箱中保藏。

1.3.3 克隆文库的检验及 RFLP 分析: 对文库的白色克隆用 M13 引物 (M13F: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3', M13R: 5'-GTAACACGACGGCCAGT-3') 进行菌落 PCR, 以检测插入子的正确性^[4]。用限制性内切酶 *Hae*III 酶切菌落 PCR 产物, 37℃ 酶切过夜, 琼脂糖凝胶电泳, 得到酶切图谱。选取 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism 限制性片段长度多态性) 图谱中条带差异的阳性克隆送上海生工测序。

将测序序列通过 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 与 GenBank 数据库中已知序列进行比对分析, 去除非放线菌序列, 再用 MEGA 5 软件对放线菌序列进行多重序列比对。以 99.0% 相似性为标准划分不同的操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU)^[5]。

1.4 分离培养基

(1) 甘油-精氨酸培养基 (GJ)^[6]; (2) 海藻糖-肌

酸培养基 (B7)^[7]; (3) 甘油-天冬氨酸培养基 (C1)^[7]; (4) 甘露醇-酸水解酪蛋白培养基 (GW1)^[8]; (5) 干酪素-甘露醇 (CMKA)^[9]; (6) 甘露醇-丙氨酸培养基 (Z5)^[7]; (7) 壳聚糖-天冬酰胺培养基 (F6)^[10]; (8) 高氏一号琼脂培养基 (GA)。

培养基 (1) - (8) 分别加入 1.5%、5%、10%、15%、20% 和 25% 六个 NaCl 浓度梯度作为放线菌分离的基础培养基。GJ-1、B7-1、C1-1、GW1-1、CMKA-1、Z5-1、F6-1 和 GA-1 是上述 8 种基础培养基营养成分 10 倍稀释后的培养基。

(9) 营养琼脂培养基 (NA): 蛋白胨 10 g, 牛肉粉 3 g, 氯化钠 5 g, 琼脂 15 g; (10) 淀粉-酪素培养基 (S-C): 淀粉 10 g, 干酪素 0.3 g, 硝酸钾 2 g, 硫酸镁 0.05 g, 磷酸氢二钾 2 g, 碳酸钙 0.02 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 15 g; (11) 蛋白胨-酵母提取物 (PYG): 胰蛋白胨 10 g, 聚蛋白胨 5 g, 酵母提取物 10 g, 葡萄糖 10 g, 氯化钙 0.2 g, 磷酸氢二钾 1.0 g, 碳酸氢钠 10 g, 硫酸镁 0.4 g, 磷酸二氢钾 1 g, 琼脂 16 g; (12) 海洋淀粉-酪蛋白培养基 (SC-SW)^[11]。

培养基 (9) - (12) 为基于咸水滩放线菌免培养结果, 选取的分离 *Amycolatopsis*、*Streptomonospora*、*Salinibacterium* 和 *Blastococcus* 4 个属的培养基。

(13) GJ-2 (甘油 0.25 g, 精氨酸 0.2 g); (14) B7-2 (海藻糖 0.5 g, 肌酸 0.1 g); (15) C1-2 (甘油 1 g, 天门冬氨酸 0.1 g); (16) GW-2 (甘露醇 0.1 g, 干酪素 0.03 g); (17) CMKA-2 (甘露醇 0.15 g, 酸水解酪蛋白 0.05 g); (18) Z5-2 (甘露醇 1 g, 丙氨酸 1 g); (19) F6-2 (壳聚糖 0.4 g, 酪素水解物 0.2 g); (20) GA-2 (淀粉 2 g); (21) ISP3-2 (燕麦片 2 g); (22) HV-2 (腐植酸 0.1 g)。

培养基 (13) - (22) 是根据土样理化参数测定结果, 参考其离子比例及 pH 值优化的培养基。碳氮源的组合为 8 种基础培养基 10 倍稀释而成, 同时添加根据土样理化参数测定结果而换算的基础盐溶液: 即每升加入氯化钾 0.04 g, 硫酸镁 1.73 g, 碳酸氢钠 0.02 g, 碳酸钙 0.46 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 微量盐 1 mL (0.001 g/L), 复合维生素 1 mL (0.5 mg/L), pH 8.2 - 8.4。

(23) MSL-1 (葡萄糖 1 g, 干酪素 0.03 g); (24) T-P-1 (海藻糖 0.5 g, 脯氨酸 0.1 g); (25) MA 2216-1 (蛋白胨 0.5 g, 酵母提取物 0.1 g); (26) NA-1 (蛋白

胨 1 g, 牛肉粉 0.3 g); (27) SC-SW-1 (可溶性淀粉 1 g, 干酪素 0.03 g); (28) ISP5-1 (甘油 1 g, 天门冬氨酸 1 g)。

培养基 (23) - (28) 均为参考文献中所报道的半咸水海洋环境放线菌的 5 种分离培养基, 即改良淀粉-酪素培养基 (MSL)^[12], 海藻糖-脯氨酸 (T-P)^[12], MA 2216 (Difco), NA (Difco), SC-SW, 和盐环境分离培养基改良 ISP5^[13] 的优化培养基。碳氮源为原始营养成分的 1/10 量, 添加根据土样理化参数测定结果而换算的基础盐溶液。

1.5 分离方法

采用稀释平板涂布法, 每种培养基各盐浓度设置 3 个平行, 37°C^[13] (S-C 培养基 30°C) 倒置培养 2 - 3 周, 采用 ISP4 培养基进行菌株纯化。

1.6 菌株鉴定及其系统发育分析

菌株基因组 DNA 的提取采用酶解法小量提取总 DNA 方法^[14], 16S rRNA 的 PCR 扩增采用细菌通用引物: 正向引物 PA (8-27f: 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和反向引物 PB (1523-1504r: 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。将扩增产物纯化后送到上海生物工程有限公司进行测序。将测序结果通过 BLAST 程序提交到 GenBank 数据库中进行相似性比对搜索, 下载相关属、种近缘菌株的 16S rRNA 基因序列, 构建系统进化树。用 MEGA5 软件中的 Clustal 程序进行多序列比对, 将生成的文件采用邻接法构建系统发育树。

2 结果

2.1 基于 16S rRNA 基因文库的阿克苏高盐咸水滩放线菌免培养多样性分析

经 16S rRNA 文库的构建对阿克苏高盐咸水滩环境进行了放线菌免培养研究共得到放线菌 434 个克隆, 归于 52 个 OTUs。采用 SPADE 软件进行放线菌多样性指数分析 (表 2), 结果表明: 物种丰富度 (Species Richness) 为 53.8; 香农指数 (Shanno Index) 为 3.381; 辛普森指数 (Simpson Index) 为 0.06191。从多样性指数来看, 该高盐环境中放线菌多样性较为丰富。从其 16S rRNA 基因克隆文库的 Rarefaction curve (图 1) 可看出, 曲线已趋于平缓, 根据 Kemp^[15] 的研究结论, 认为库容已经足够, 涵盖了该环境放线菌的大多数物种。

表 2. 阿克苏高盐咸水滩放线菌多样性指数

Table 2. Actinobacterial diversity index of Hypersaline beach from Aksu

Library	No. of OTUs	Species richness		Shanno index		Simpson index	
		ACE-1	95% CIs	Chao&Shen	95% CIs	MLE	95% CIs
Hypersaline beach	52	53.8	(52.3, 61.1)	3.381	(3.152, 3.611)	0.06191	(0.04631, 0.07752)

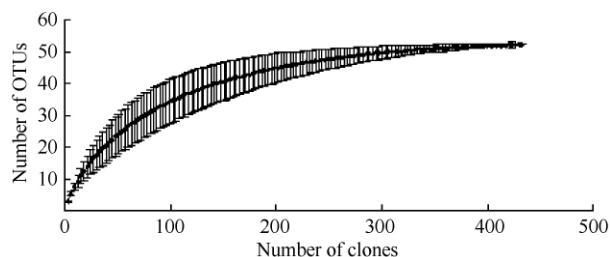


图 1. 阿克苏高盐咸水滩文库放线菌稀有度曲线

Figure 1. Rarefaction curve for Actinobacterial library of Hypersaline beach from Aksu

对克隆文库所得到的 52 个 OTUs 构建系统发育树 (图 2)。从系统发育树可以看出序列代表的菌株分布在放线菌纲中的 3 个亚纲, 即放线菌亚纲 (Actinobacteridae), 酸微菌亚纲 (Acidimicrobidae) 和红色杆菌亚纲 (Rubrobacteridae), 24 个属, 即朴勇河氏菌属 (*Yonghaparkia*)、盐水杆菌属 (*Salinibacterium*)、利夫森氏菌属 (*Leifsonia*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、去甲基醯菌属 (*Demequina*)、纤维单孢菌属 (*Cellulomonas*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、考克氏菌属 (*Kocuria*)、涅斯捷连科氏菌属 (*Nesterenkonia*)、罗氏菌属 (*Rothia*)、海居菌属 (*Marihabitans*)、博戈里亚湖菌属 (*Bogoriella*)、棒杆菌属 (*Corynebacterium*)、弗莱德门氏菌属 (*Friedmanniella*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、链单孢菌属 (*Streptomonospora*)、高温双歧菌属 (*Thermobifida*)、芽生球菌属 (*Blastococcus*)、拟无枝酸菌属 (*Amycolatopsis*)、列舍瓦列氏菌属 (*Lechevalieria*)、*Ilumatobacter*、*Iamia*、红色杆菌属 (*Rubrobacter*) 和嗜热油菌属 (*Thermoleophilum*)。

2.2 阿克苏高盐咸水滩放线菌分离新策略比较

经分离策略优化后, 从阿克苏高盐咸水滩环境, 共分离到 403 株放线菌, 4 种策略分离放线菌结果见表 3。结果表明: 8 种基础培养基均没有获得任何放线菌菌株, 而经 10 倍稀释后共分离到 3 个属的放线菌, 即链霉菌属 (*Streptomyces*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*) 和高温双歧菌属 (*Thermobifida*)。Z5-1 分离到 3 株放线菌, F6-1 和 GW1-1 各分离到 1 株放线菌, 表现出适合于盐环境分离的经典培养基

Z5、F6 和 GW1 变为寡营养培养基后用于极度高盐环境样品同样显示出较好的分离效果。

基于放线菌免培养结果, 选择与其最相近已发表种的分离培养基如 NA、S-C、PYG 和 SC-SW 等, 参考其培养条件针对性地对免培养结果中的 *Amycolatopsis*、*Streptomonospora*、*Salinibacterium* 和 *Blastococcus* 进行分离培养。结果表明: 分离获得了免培养中揭示的 *Amycolatopsis* 和 *Streptomonospora* 2 个属, *Amycolatopsis fastidiosa*、*Streptomonospora alba*、和 *Streptomonospora amylolytica* 3 个物种。说明根据免培养中揭示的放线菌物种, 依据其营养成分和培养条件进行分离培养基的设计是可行的, 可以快速挖掘相应放线菌菌种资源。

借鉴半咸水海洋环境放线菌分离优化的 5 种培养基共分离到 7 个属的放线菌, 即 *Streptomyces*、*Micromonospora*、*Streptomonospora*、*Saccharomonospora*、*Nocardiopsis*、*Actinomadura* 和 *Nonomuraea*。本研究中参考波罗的海半咸水海洋放线菌分离培养基经优化后的 T-P-1 和 MSL-1 培养基分离效果较好, 各分离到 6 个属和 3 个属的放线菌。两者基础培养基一致, 仅在碳氮源的选择上略有不同, 从分离结果来看, T-P-1 (海藻糖为碳源, 脯氨酸为氮源) 时放线菌分离效果最好。

结合土样的理化性质特点优化设计的 GJ-2、B7-2、C1-2、GW1-2、CMKA-2、Z5-2、F6-2、GA-2、ISP3-2 和 HV-2 培养基共分离到 318 株放线菌, 分属于 13 个属, 即 *Streptomyces*、*Micromonospora*、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*)、糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*)、链单孢菌属 (*Streptomonospora*)、拟无枝酸菌属 (*Amycolatopsis*)、马杜拉菌属 (*Actinomadura*)、野野村氏菌属 (*Nonomuraea*)、放线多孢菌属 (*Actinopolyspora*)、栖白蚁菌属 (*Isopterocola*)、植物放线孢囊菌属 (*Plantactinospora*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*) 和糖霉菌属 (*Glycomyces*)。从放线菌分离种属来看, 培养基 GJ-2 (甘油为碳源; 精氨酸为氮源) 效果最好, 能分离到 10 个属的放线菌; 其次是 C1-2 培养基 (甘油为碳源; 天门冬氨酸为氮源), 分

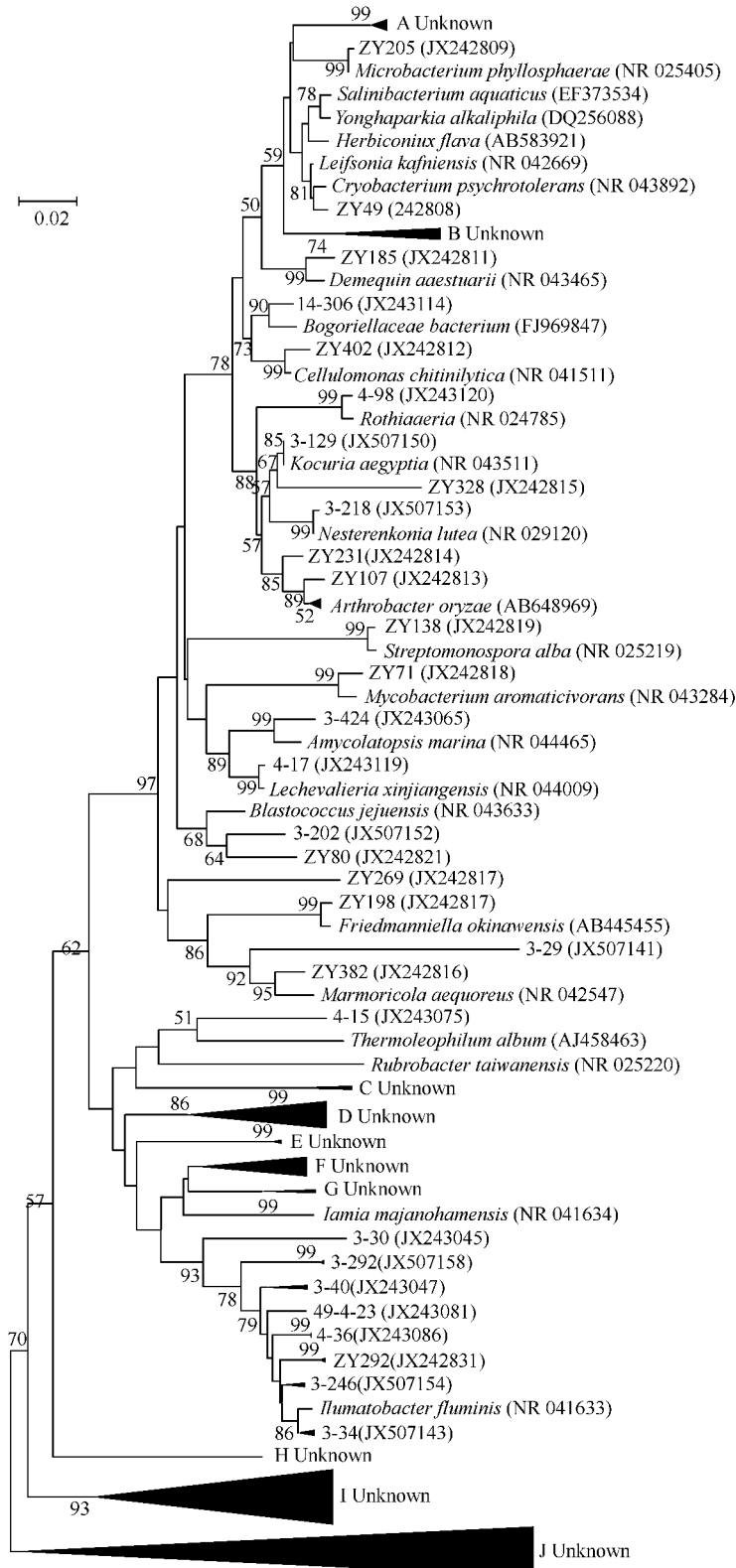


图 2. 放线菌克隆序列 16S rRNA 基因为基础的系统发育树

Figure 2. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among acinobacterial 16S rRNA gene Sequences. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000sample date sets. The scale bar represents the estimated number of base changes per nucleotide sequence position. Sequences of clones detected in this study are indicated with "JX". The numbers in parentheses are accession numbers of sequences.

离到 7 个属的放线菌; 以及 Z5-2 培养基(甘露醇为碳源; 丙氨酸为氮源) 分离到 6 个属的放线菌, GW-2 和 CMKA-2(甘露醇为碳源; 干酪素为氮源) 均分离到 5 个属的放线菌。但从放线菌的出菌率来看, Z5-2 出菌率最高, 达 21.38%, 其次是 B7-2(海藻糖为碳源; 肌酸为氮源) 和 GJ-2 出菌率分别为 17.30% 和 15.09%。

据土样理化因子设计培养基结果表明, 本实验室筛选出来的 8 种培养基其碳氮源减为 1/10 量, 添加据土样理化性质优化的基础盐溶液获得了较多的放线菌菌株。这一结果显示本实验室 8 种培养基对高盐咸水滩环境放线菌分离依然很好, 放线菌可能比较偏爱自己原始的生存环境, 在培养基设计时需结合其自身特点进行离子配比的优化。

表 3. 基于不同分离策略优化培养基上放线菌分离菌属比较

Table 3. Comparison of actinobacterial genus by different selective strategies

Control group	Genus	Media of strategy 1	Genus	Media of strategy 2	Genus	Media of strategy 3	Genus	Media of strategy 4	Genus
GJ	-	NA	<i>Amycolatopsis</i>	GJ-1	-	GJ-2	<i>Plantactinospira</i> <i>Glycomyces</i> <i>Streptomyces</i> <i>Saccharomonospora</i> <i>Micromonospora</i>	MSL-1	<i>Amycolatopsis</i> <i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i> <i>Nocardiopsis</i>
B7	-	S-C	<i>Streptomonospora</i>	B7-1	-	B7-2	<i>Micromonospora</i> <i>Saccharomonospora</i>	T-P-1	<i>Nocardiopsis</i> <i>Streptomyces</i> <i>Actinomadura</i> <i>Saccharomonospora</i> <i>Nonomuraea</i> <i>Nocardiopsis</i>
C1	-	PYG	-	C1-1	-	C1-2	<i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i> <i>Nocardia</i> <i>Nocardiopsis</i> <i>Saccharomonospora</i> <i>Streptomonospora</i>	MA2216-1	<i>Streptomyces</i>
GW1	-	SC-SW	-	GW1-1	<i>Thermobifida</i>	GW1-2	<i>Streptomyces</i> <i>Nocardiopsis</i> <i>Streptomonospora</i> <i>Saccharomonospora</i>	NA-1	<i>Streptomyces</i>
CMKA	-			CMKA-1	-	CMKA-2	<i>Streptomyces</i> <i>Actinopolyspora</i> <i>Nocardiopsis</i> <i>Nonomuraea</i> <i>Saccharomonospora</i>	SC-SW-1	<i>Streptomyces</i>
Z5	-			Z5-1	<i>Micromonospora</i>	Z5-2	<i>Streptomyces</i> <i>Amycolatopsis</i> <i>Isoptricola</i> <i>Micromonospora</i> <i>Nocardiopsis</i> <i>Saccharomonospora</i>	ISP5-1	<i>Streptomyces</i>
F6	-			F6-1	<i>Streptomyces</i>	F6-2	<i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i> <i>Nocardiopsis</i> <i>Saccharomonospora</i>		
GA	-			GA-1	-	GA-2	<i>Streptomyces</i> <i>Micromonospora</i> <i>Nocardiopsis</i> <i>Saccharomonospora</i>		
						ISP3-2	<i>Streptomyces</i> <i>Actinomadura</i> <i>Saccharomonospora</i> <i>Nocardiopsis</i>		
						HV-2	<i>Streptomyces</i>		

(Media of Strategy 1): Media based on culture guided by uncultured molecular technology method; (Media of Strategy 2): Optimized media based on oligotroph; (Media of Strategy 3): Optimized media based on geochemical parameters; (Media of Strategy 4): Optimized media based on brackish marine environment; (-): Unobtained actinobacterial strains.

2.3 可培养放线菌多样性

阿克苏高盐咸水滩环境, 经 4 种分离策略优化后共分离到 403 株放线菌。通过形态特征、16S rRNA *HaeIII* 酶切图谱(图 3)等手段剔除重复菌株后, 选取代表性菌株进行 16S rRNA 测序分析, 结果

表明放线菌多样性极为丰富, 分布于放线菌 8 个亚目 10 个科及 14 个属(见表 4)。*Streptomyces* 是优势菌属, 占 69.96%, 其中在 1.5% - 5% 盐浓度下可达 64.76%, 其次是 *Nocardiopsis* 和 *Micromonospora*, 分别占 7.69% 和 6.95%。

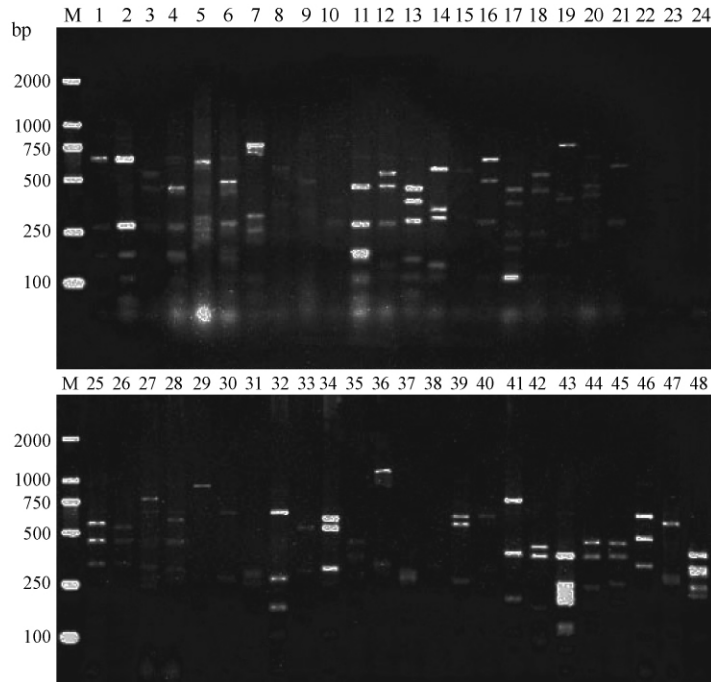


图 3. 可培养放线菌 *HaeIII* 酶切电泳图

Figure 3. Agarose gel electrophoresis of cultured Actinobacteria digest by *HaeIII*. M, DNA marker DL2000; lane 1 - 48, Number of Actinobacteria.

表 4. 不用盐浓度下 4 种分离策略的放线菌物种分布

Table 4. Distribution of actinobacteria isolated from soil sample by four strategies with different salt contents

Suborder	Family	Genus	Ratio/ %	Salt content					
				1.5%	5%	10%	15%	20%	25%
<i>Corynebacterineae</i>	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	0.25	1	-	-	-	-	-
		<i>Streptomonospora</i>	5.46	1	-	7	2	1	-
<i>Streptosporangineae</i>	<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis</i>	7.69	10	11	15	4	1	-
		<i>Thermobifida</i>	0.50	-	2	-	-	-	-
	<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Nonomuraea</i>	0.50	4	-	-	-	-	-
		<i>Thermonosporaceae</i>	<i>Actinomadura</i>	0.99	4	1	-	-	-
<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	69.96	172	89	6	1	-	
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Amycolatopsis</i>	1.49	6	-	-	-	-	
		<i>Saccharomonospora</i>	6.70	1	6	3	15	5	-
<i>Micromonosporineae</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i>	6.95	27	1	-	-	-	
		<i>Plantactinospora</i>	0.50	2	-	-	-	-	
<i>Glycomycineae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	<i>Glycomyces</i>	0.25	1	-	-	-	-	
<i>Actinopolysporineae</i>	<i>Actinopolysporaceae</i>	<i>Actinopolyspora</i>	0.50	-	-	-	-	2	
<i>Micrococccineae</i>	<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Isoptericola</i>	0.50	-	-	2	-	-	

(-): Unobtained actinobacterial strains

不同盐浓度培养基分离到的放线菌种类有明显差异。1.5%和5%盐浓度的培养基分离到菌株最多。1.5%和5%盐浓度培养基分离到放线菌为 *Streptomyces*、*Nocardiopsis*、*Micromonospora*、*Streptomonospora*、*Actinomadura*、*Nonomuraea*、*Amycolatopsis*、*Nocardia*、*Plantactinospora*、*Thermobifida* 和 *Glycomyces* 共 11 个属。10%和20%盐浓度培养基分离到放线菌 *Streptomyces*、*Nocardiopsis*、*Saccharomonospora*、*Streptomonospora*、*Isoptericola* 和 *Actinopolyspora* 6 个属。*Streptomyces*、*Saccharomonospora* 和 *Streptomonospora* 放线菌对盐浓度的耐受性较广,从 1.5% - 20% 盐浓度的

培养基上基本上都能生长,但 *Actinopolyspora* 能在高盐浓度(20%)培养基上所分离到。

菌株 TRM46796-22、TRM46797-38、TRM46794-61、TRM46796-8、TRM46796-54、TRM46793-9、TRM46794-36、TRM46793-6 和 TRM46796-34 等 9 株放线菌与已发表菌株的 16S rRNA 基因相似性均低于 97%, 可能代表着 *Streptomyces* 和 *Saccharomonospora* 属的潜在新种,其分类地位尚需要通过多相分类手段进一步鉴定。

阿克苏高盐咸水滩放线菌与 GenBank 数据库中已知序列菌株的系统发育关系如图 4。

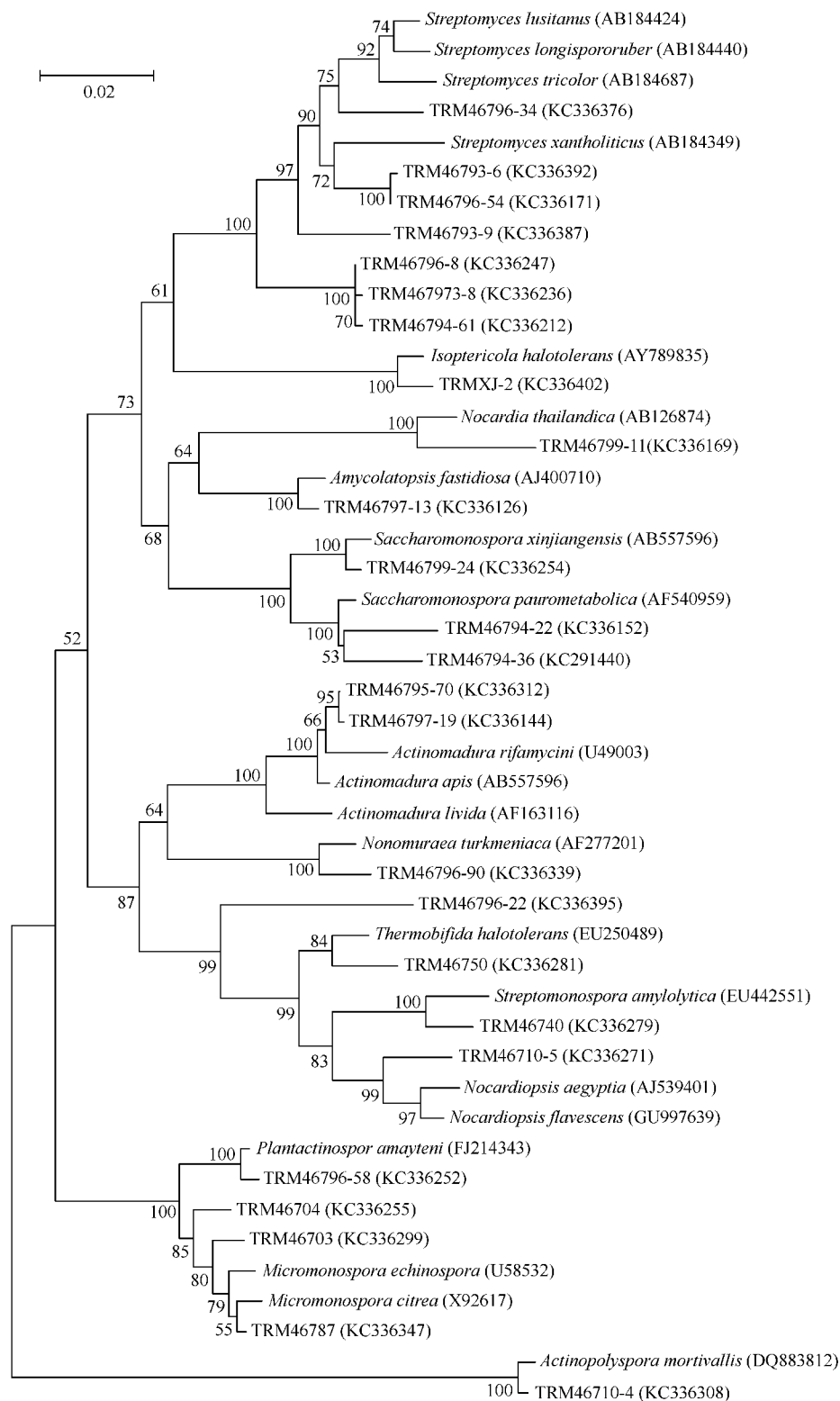


图 4. 阿克苏高盐咸水滩样品放线菌系统发育树

Figure 4. Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships of Actinobacterial sequences obtained from hypersaline beach of Aksu with closely related type strains. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000sample date sets. The scale bar represents the estimated number of base changes per nucleotide sequence position. Sequences of isolated strains in this study are indicated with "TRM". The numbers in parentheses are accession numbers of sequences.

3 讨论

一直以来,分离方法是限制人们开发利用微生物资源的“瓶颈”。对高盐咸水滩放线菌资源的认识和挖掘,必须建立在充足的菌种资源基础上。因此探讨高盐咸水滩环境放线菌的分离培养方法则显得尤为重要。

笔者对阿克苏高盐咸水滩环境的放线菌免培养研究证明,其存在有大量至今未获得纯培养的放线菌新类群,有的甚至在科级或者更高的分类水平上(70.8%的克隆序列与已发表菌株 16S rRNA 序列同源性低于 97%)。为更大限度地分离环境中放线菌物种资源,本研究采用放线菌免培养分子技术指导可培养进行有目的分离,结果分离到免培养分析结果中的 *Amycolatopsis* 和 *Streptomonospora* 2 个属的放线菌。免培养结果中的 *Streptomonospora alba* (NR_025219) 是由 20% 盐浓度淀粉-酪素培养基,从新疆盐碱环境中所分离到,其对 NaCl 的耐受性极强,而该土样的平均盐含量达 20.16%,说明此环境有极其耐盐或依赖于盐维持生长的微生物存在。*Amycolatopsis* 能够产生利福霉素、利托菌素和抑制细菌及癌细胞等新抗生素。因此,免培养获得的物种多样性信息可以指导我们针对性地改良或优化分离培养基和培养条件,发掘更多潜在的放线菌资源。

目前研究者已将 *Demequina* 和 *Iamia* 等定义为海洋特有放线菌,然而从海滩、退潮沉积物及海洋沉积物等海域特殊生境所分离到的 *Ilumatobacterfluminis* (NR_041633)、*Blastococcusjejuensis* (NR_043633)、*Demequinaaestuarii* (NR_043465)、*Marmoricolaaequoreus* (NR_042547) 和 *Iamiamajanohamensis* (NR_041636) 等放线菌在阿克苏咸水滩中也被发现,且对盐有一定的耐受性。阿克苏高盐咸水滩与上述环境有一定的相似之处,虽然表面已无积水,但所采到的样品呈淤泥状,含盐量较高。结果说明这些物种可能不仅是海洋环境特有,在一些高盐咸水滩环境中也有分布。这一结果为高盐咸水滩环境中微生物的分离可参考海洋环境微生物的分离策略提供了一定的参考。本研究通过参考海洋来源培养基策略的探讨也证实了此点。

研究者提出高盐环境放线菌分离方法的研究应跳出普通环境放线菌分离的思路,尽可能地模拟盐

环境条件,必须综合考虑特殊的分离策略,特殊的营养要求等多种因素来设计分离程序。本研究结合阿克苏咸水滩环境特点,添加据土样理化性质所设计的基础盐溶液,pH 提高到 8.2 - 8.4 进行培养基的优化后,获得了大量放线菌资源。目前有关盐环境可培养放线菌物种多样性的报道较多,总体来看 *Streptomyces*、*Streptomonospora*、*Saccharomonospora*、*Actinopolyspora* 和 *Nocardiopsis* 是盐环境中常见放线菌类群,但 *Plantactinosporea*、*Nocardia*、*Isosporicicola*、*Nonomuraea*、*Thermobifida* 和 *Actinomadura* 等在高盐环境中极少能分离到。因此据土样理化性质模拟原始生态环境对高盐环境放线菌的分离验证了环境因子对微生物的分离培养尤为重要。也有学者对分离死海高盐地区嗜盐耐盐放线菌的方法学进行了探讨,发现土样经微波与化学孢子活化剂共同处理,在一定复合盐培养基上分离效果较好^[16]。因此微生物资源的分离程序要不断完善、不断更新,甚至永远创新。

“寡营养”(Oligotroph)一词是由 Weber^[17] 最先提出的。绝大多数自然环境都是以寡营养为特征的,大多数土壤也经常处于营养缺乏状态,主要是由于某些生态系统(荒漠、火山际地、冻原等)的地上植被生产力不高使土壤有机物质含量较低。新疆高盐环境隶属于寡营养特殊生境,周围几乎没有植被,本研究主要对新疆阿克苏地区含盐量高达 20% 以上的典型咸水滩进行放线菌分离策略的探讨。结果表明,营养成分较丰富的培养基可能不适合于此环境中放线菌的分离,而寡营养成分培养基较适合于高盐咸水滩环境放线菌的分离,培养基的营养成分经 10 倍稀释后分离到其他策略没有获得的稀有放线菌 *Thermobifida* 属,有研究报道 *Thermobifida* 属放线菌有可降解木质纤维素和聚对苯二甲酸乙二酯 (polyethylene terephthalate PET) 等重要用途,因此其在工业和环保领域有重要的应用潜力。寡营养环境中微生物的发现和对于人们认识生物的进化生态学以及早期生物在地球环境有机化过程中的作用也具有重要的理论意义。

Kasai 等研究发现 *Micromonospora* 的种之间的 16S rRNA 基因序列相似性高达 99.3%,2 个种之间的 DNA-DNA 同源性依然小于 70%^[18]。意味着在 *Micromonospora* 中,种间 16S rRNA 基因序列相似性不高于 99.3% 的很可能为新种。该环境共分离到

28 株 *Micromonospora* 菌株, 发现 12 株 (42.86%) 与该属数据库中最相近代表种的同源性均小于 99.3%, 如 TRM46703 (KC336299) 与 *Micromonosporaethinaurantiaca* 同源性为 98.300%, TRM46787 (KC336347) 和 TRM46799-1 (KC336357) 分别与 *Micromonosporaechinospira* 同源性为 98.769% 和 98.874%, TRM46704 (KC336255) 和 TRM46794-48 (KC336368) 与 *Micromonosporatulbaghia* 同源性分别为 98.172% 和 98.537%, 意味着新疆高盐咸水滩环境还蕴含着该属的许多新类群。有报道 *Micromonospora* 属是放线菌内除 *Streptomyces* 产生生物活性代谢物最多的类群^[19], 因此启示我们该地区分离的 *Micromonospora* 菌株尤其是新型类群有进一步深入挖掘的价值。

本研究通过 4 种新策略对高盐咸水滩进行了放线菌分离工作的探讨, 结果分离到常规培养基分离不到的菌株, 还发现不少放线菌潜在新种, 同时也为后续分离工作提供了一定的参考价值。实验证明甘油、海藻糖、甘露醇和壳聚糖为分离高盐咸水滩环境的理想碳源, 精氨酸、脯氨酸、肌酸、天门冬氨酸和丙氨酸为理想氮源。与本实验室对新疆硝尔库勒盐湖放线菌分离方法初探结果相似, 以渗透调节物作为碳源和氮源是高盐环境放线菌分离比较理想的选择。

参考文献

- [1] Miyadoh S. Research on antibiotic screening in Japan over the last decade: a producing microorganism approach. *Actinomycetologica*, 1993, 7(1): 100-106.
- [2] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [3] Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10): 828-841.
- [4] Jiang HC, Dong HL, Zhang GX, Yu BS, Chapman LR, Fields MW. Microbial Diversity in Water and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwest China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3832-3845.
- [5] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6189-6200.
- [6] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1966, 16:313-340.
- [7] 陈正军. 硝尔库勒湖放线菌多样性及聚酮类功能基因的发掘. 塔里木大学硕士学位论文, 2012.
- [8] Guan T, Wu J, Tan S, Xu L, Li W, Zhang L. Phylogenetic diversity of halophilic actinomycetes from hypersaline environments in Tarim Basin of Xinjiang. *China Microbiology*, 2008, 35(11): 1698-1702. (in Chinese)
关统伟, 吴晋元, 唐蜀昆, 徐丽华, 李文均, 张利莉. 新疆塔里木盆地可培养嗜盐放线菌系统发育多样性. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1698-1702.
- [9] Guan T, Zhao K, Xia Z, Lv L, Zhang XP, Zhang L. Comparison of isolation media for actinobacteria from different saline environments in Xinjiang, China. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2010, 16(3): 429-431. (in Chinese)
关统伟, 赵珂, 夏占峰, 吕玲玲, 张小平, 张利莉. 新疆高盐环境土壤放线菌分离培养基比较. 应用与环境生物学报, 2010, 16(3): 429-431.
- [10] Xia Z, Guan T, Ruan J, Huang Y, Zhang L. Studies on the actinobacterial diversity in Aiding Lake Sediments. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1023-1031. (in Chinese)
夏占峰, 关统伟, 阮继生, 黄英, 张利莉. 艾丁湖沉积物放线菌多样性. 微生物学报, 2011, 51(8): 1023-1031.
- [11] Lee SD. *Blastococcusjejuensis* sp. nov., an actinomycete from beach sediment, and emended description of the genus *Blastococcus* Ahrens and Moll 1970. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56, 2391-2396.
- [12] Jiang Y, Cao Y, Wang Q, Jin R. Diversity of cultured actinomycete in the Baltic Sea. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(11): 1461-1467. (in Chinese)
姜怡, 曹艳茹, 王茜, 靳荣线. 波罗的海放线菌的多样性. 微生物学报, 2011, 51(11): 1461-1467.
- [13] Tan S, Jiang Y, Zhi X, Lou K, Li W, Xu L. Isolation methods of halophilic Actinobacteria. *Microbiology*, 2007, 34(2): 390-392. (in Chinese)
唐蜀昆, 姜怡, 职晓阳, 娄凯, 李文均, 徐丽华. 嗜盐放线菌分离方法. 微生物学通报, 2007, 34(2): 390-392.
- [14] 徐丽华, 李文均, 刘志恒. 放线菌系统学——原理、方法及实践. 北京: 科学出版社, 2007.
- [15] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47(2): 161-177.
- [16] Ren H, Lai H, Wang C, Wei X. Study on method of actinomycetes isolation from Dead Sea. *Journal of*

Northwest A&F University, 2012, 40(6):141-146. (in Chinese)

任海柯, 来航线, 王晨霞, 韦小敏. 死海嗜盐耐盐放线菌分离方法研究. 西北农林科技大学学报, 2012, 40(6):141-146.

- [17] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95

(8):6578-6583.

- [18] Kasai H, Tamura T, Harayama S. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from gyrB-based phylogeny and DNA relatedness. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(1):127-134.

- [19] Berdy J. Bioactive microbial metabolites, a personal view. *Journal Antibiotics*, 2005, 58(1):1-26.

New isolation methods and phylogenetic diversity of Actinobacteria from hypersaline beach in Aksu

Yao Zhang^{1,2}, Zhanfeng Xia^{1,2}, Xinbo Cao², Jun Li², Lili Zhang^{1,2*}

¹Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps, Tarim University, Alar 843300, China

²College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China

Abstract: [Objective] We explored 4 new methods to improve the isolation of actinobacterial resources from high salt areas. [Methods] Optimized media based on 4 new strategies were used for isolating actinobacteria from hypersaline beaches. Glycerin-arginine, trehalose-creatine, glycerol-aspartic acid, mannitol-casein, casein-mannitol, mannitol-alanine, chitosan-asparagine and GAUZE' No. 1 were used as basic media. New isolation strategy includes 4 methods: ten-fold dilution culture, simulation of the original environment, actinobacterial culture guided by uncultured molecular technology detected, and reference of actinobacterial media for brackish marine environment. The 16S rRNA genes of the isolates were amplified with bacterial universal primers. The results of 16S rRNA gene sequences were compared with sequences obtained from GenBank databases. We constructed phylogenetic tree with the neighbor-joining method. [Results] No actinobacterial strains were isolated by 8 media of control group, while 403 strains were isolated by new strategies. The isolates by new methods were members of 14 genera (*Streptomyces*, *Streptomonospora*, *Saccharomonospora*, *Plantactinospora*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Glycomyces*, *Micromonospora*, *Nocardioopsis*, *Isoptericola*, *Nonomuraea*, *Thermobifida*, *Actinopolyspora*, *Actinomadura*) of 10 families in 8 suborders. The most abundant and diverse isolates were the two suborders of *Streptomycineae* (69.96%) and *Streptosporangineae* suborder (9.68%) within the phylum *Actinobacteria*, including 9 potential novel species. [Conclusion] New isolation methods significantly improved the actinobacterial culturability of hypersaline areas, and obtained many potential novel species, which provided a new and more effective way to isolate actinobacteria resources in hypersaline environments.

Keywords: hypersaline beach, actinobacteria, isolation strategy, isolation medium

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31060001), by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2010CB134505) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2012AA021705)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-997-4681612; E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn

Received: 5 January 2013/Revised: 1 April 2013