



青藏高原阿里、那曲和海西地区土壤可培养放线菌的多样性

黄娇^{1,2}, 闫兵法^{1,2}, 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 中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

摘要:【目的】为了研究青藏高原北部地区土壤可培养放线菌的多样性, 并比较不同选择性分离培养基对高原土壤放线菌的分离效果。【方法】使用 9 种分离培养基, 并尝试添加藤黄微球菌发酵液, 对采集自阿里、那曲和海西地区的 14 份土壤样品中的放线菌进行选择分离。通过 16S rRNA 基因序列分析对分离菌株进行初步分类鉴定, 并在不同分类水平上统计所分离得到的放线菌多样性。【结果】分离得到去重复后的放线菌 255 株, 分布于放线菌门的 8 个目, 14 个科, 23 个属, 包含 94 个可能的物种。其中至少 25 个物种可能为新种, 分布于 13 个属。链霉菌属的菌株 108 株, 可能的物种 28 个, 是最主要的优势菌属。分离培养基中添加藤黄微球菌发酵液明显增加了放线菌分离菌株的数量和多样性, 稀释的葡萄糖酵母麦芽汁培养基适合分离链霉菌, 淀粉甘油脯氨酸培养基、丙酸钠酪蛋白培养基等则适合分离稀有放线菌。【结论】青藏高原北部土壤放线菌多样性非常丰富, 并且存在较多的新颖放线菌类群; 添加藤黄微球菌发酵液是提高放线菌分离效率的有效手段。

关键词: 青藏高原, 可培养放线菌, 多样性, 分离, 16S rRNA 基因

放线菌是一类具有重要经济价值的革兰氏阳性细菌, 已知的微生物生物活性物质中, 约有 40% 是由放线菌产生的, 包括抗菌剂、抗真菌剂、抗肿瘤制剂、杀虫剂、除草剂、免疫抑制剂等^[1-2]。在医药工业上广泛应用的抗生素中, 约 70% 是由放线菌产生的^[1]。而且, 放线菌在环境有机质的降解矿化、矿物营养固定、固氮、改善环境理化参数等方面也扮演着重要生态角色^[3-4]。

放线菌在自然界中分布广泛, 近年来, 为了获取新的放线菌资源, 人们逐渐将目光投向一些特殊生境, 如深海、沙漠、盐湖等^[5]。青藏高原是世界上海拔最高的高原, 有“世界屋脊”和“第三极”之称, 其高海拔、低气温、长日照、强辐射等气候特征赋予了该地域特殊的土壤微生物资源, 也可能赋予该地域微生物特殊的次级代谢能力和生态功能。近 20 年来, 我国科研人员对青藏高原土

基金项目: 科技基础性工作专项(2015FY110100)

*通信作者。Tel: +86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn

收稿日期: 2017-04-19; 修回日期: 2017-05-02; 网络出版日期: 2017-06-15

壤放线菌的多样性、生物学活性、降解特性等进行了一系列研究^[6-8], 结果表明青藏高原土壤中放线菌的多样性丰富, 具有生物活性的放线菌种类较多, 而且还存在一些未知的放线菌, 值得我们对“世界屋脊”的放线菌开展进一步研究。本研究中, 我们采用了青藏高原北部的西藏阿里、那曲和青海海西地区的土壤样品, 希望能够进一步阐明该地域土壤可培养放线菌的多样性, 并对其新颖性进行评估。

在放线菌的分离培养方面, 已经发展出了若干种选择性培养基和预处理方法^[9]。藤黄微球菌是放线菌成员之一, 其细胞在长期的静置培养过程中会进入类似休眠的 VBNC (viable but non-culturable) 状态, 并且该菌在生长后期能够分泌一种本质为小分子蛋白质的复苏促进因子 Rpf (Resuscitation promoting factor), 不仅能够促进其自身处于 VBNC 状态细胞的复苏, 而且能够促进与之近缘的革兰氏阳性细菌的复苏生长^[10-11]。因此, 本研究中我们尝试在分离培养基中添加藤黄微球菌发酵液, 以期促进青藏高原土壤中放线菌的复苏生长和分离培养。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品: 14 份土样由中国科学院南京土壤研究所土壤与农业可持续发展国家重点实验室提供, 其中 5 份采自西藏阿里地区, 5 份采自西藏那曲地区, 4 份采自青海海西蒙古族藏族自治州。采样点海拔 4400–5000 m, 采样时间为 2011 年 7–8 月, 样品置于无菌自封袋内, 室温运回实验室后 –80 °C 保藏。采样信息见表 1。

表 1. 采样位点信息

Table 1. Information of sampling sites

No.	Sampling site	Longitude/°E	Latitude/°N	Altitude/m
1	P797	92.56	34.56	4555
2	P798	92.37	34.22	4625
3	P799	92.21	33.57	4619
4	P801	92.06	33.43	4697
5	P804	91.40	32.11	4632
6	P813	90.37	30.12	4557
7	P015-B	90.40	31.37	4628
8	P022-B	88.94	32.52	4990
9	P029-B	86.89	33.19	4650
10	P038-B	84.67	32.17	4433
11	P039-B	84.03	32.23	4521
12	P042-B	82.91	32.38	4459
13	P044-B	81.83	32.07	4601
14	P045-B	80.86	32.35	4751

1.1.2 主要试剂和仪器: 细菌基因组提取试剂盒和 2×PCR mix (含 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂) 购自北京博迈德基因技术有限公司, DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR 仪、电泳仪及凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司; 离心机购自德国 Eppendorf 公司, 恒温培养箱购于上海博迅医疗生物仪器股份有限公司, 摇床、超净工作台购于北京东联哈尔仪器制造有限公司。培养基中涉及的所有试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 分离培养基: 培养基 M1–M7 参照文献[8]: M1, 淀粉甘油脯氨酸培养基; M2, 组氨酸棉籽糖培养基; M3, 纤维素培养基; M4, 木糖酪蛋白培养基; M5, 腐殖酸培养基; M6, 几丁质培养基; M7, 丙酸钠酪蛋白培养基。各培养基添加 15% 的琼脂制成固体培养基。

1/4 GYM (稀释的葡萄糖酵母麦芽汁培养基): 葡萄糖 1.000 g, 酵母提取物 1.000 g, 麦芽提取物

2.500 g, CaCO_3 0.500 g, 放线菌酮 0.050 g, 新生霉素 0.005 g, 氨曲南 0.025 g, 琼脂 15.000 g, 蒸馏水 1000 mL。

1/4 GYM+F: 藤黄微球菌在 1/4 GYM 液体培养基中 28 °C、200 r/min 摇瓶培养 20 d 然后在室温静置 1 周, 静置后的上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 获得藤黄微球菌无菌发酵液。倒平皿前将 1/4 GYM 与藤黄微球菌无菌发酵液 3:1 (V/V) 混合。

1.2 样品预处理

土壤样品于进行菌种分离前 2 周自然风干。取 2.0 g 风干的样品加入含 18 mL 无菌蒸馏水的锥形瓶中, 内置无菌玻璃珠, 28 °C、180 r/min 振荡 2 h。随后进行水浴超声波处理, 超声功率 100 W、频率 40 kHz, 水浴温度 28 °C, 处理时间 40 min。

1.3 菌株分离培养、纯化及保藏

将预处理后的土壤悬浮液做梯度稀释, 选 10^{-2} 和 10^{-3} 稀释度样品涂布于上述分离培养基平皿, 每个平皿接种 100 μL , 每个稀释度设 3 个平行。分离平皿于 28 °C 倒置培养 2–3 周后观察菌落生长情况, 挑取单菌落至 GYM 培养基上纯化。根据纯化菌落的培养特征和样品来源进行去重复, 刮取去重复后的纯培养物于 20% 甘油中 -80 °C 保藏。

1.4 菌株 16S rRNA 基因测序和序列分析

菌株 DNA 提取按 Chun 等方法进行^[12]。16S rRNA 基因的 PCR 扩增和测序引物均为通用保守引物 27f 和 1492r。测序工作由北京博迈德基因技术公司完成。将分离菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对, 确定与之亲缘关系最近的种属。从数据库获得相关种属的 16S rRNA 基因序列, 用 MEGA 6.0 软件^[13]构建系统发育树。序列比对用 CLUSTAL X1.8 program^[14], 进化树的构建用 Maximum-Likelihood

(ML)^[15]和 Neighbor-Joining (NJ)方法^[16]。

为进一步研究分离菌株的物种多样性, 使用 QIIME 软件^[17]中的 Uclust^[18]程序, 以 16S rRNA 基因序列相似性 99%为阈值^[19], 将分离菌株划分为不同的操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs)。

2 结果和分析

2.1 放线菌多样性分析

用分离培养基 M1–M7 对所有 14 份样品进行了分离, 纯化去重复后得到放线菌 177 株; 随后又用培养基 1/4 GYM 和 1/4 GYM+F 对样品 1–8 (即编号为 P797、P798、P799、P801、P804、P813、P015-B 和 P022-B 的样品)进行了分离, 得到放线菌 78 株。共获得放线菌 255 株, 分布于放线菌门的 8 个目, 分别是棒杆菌目 (Corynebacteriales)、姜氏菌目 (Jiangellales)、微球菌目 (Micrococcales)、小单孢菌目 (Micromonosporales)、丙酸杆菌目 (Propionibacteriales)、假诺卡氏菌目 (Pseudonocardiales)、链霉菌目 (Streptomycetales) 和链孢囊菌目 (Streptosporangiales); 14 个科, 分别是博戈里亚湖菌科 (Bogoriellaceae)、短杆菌科 (Brevibacteriaceae)、姜氏菌科 (Jiangellaceae)、微杆菌科 (Microbacteriaceae)、微球菌科 (Micrococcaceae)、小单孢菌科 (Micromonospora)、分枝杆菌科 (Mycobacteriaceae)、诺卡氏菌科 (Nocardiaceae)、类诺卡氏菌科 (Nocardioidaceae)、原小单孢菌科 (Promicromonosporaceae)、假诺卡氏菌科 (Pseudonocardiaceae)、链霉菌科 (Streptomycetaceae)、链孢囊菌科 (Streptosporangiaceae) 和高温单孢菌科 (Thermomonosporaceae); 23 个属: 马杜拉放线菌属 (*Actinomadura*)、放线孢菌属 (*Actinomycetospira*)、

壤霉菌属(*Agromyces*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、柠檬球菌属(*Citricoccus*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、乔治菌属(*Georgenia*)、姜氏菌属(*Jiangella*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)、考克斯菌属(*Kocuria*)、伦茨菌属(*Lentzea*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、野野村氏菌属(*Nonomuraea*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和链孢囊菌属

(*Streptosporangium*) (表 2)。其中链霉菌属的菌株 108 株, 占分离菌株的 42.4%, 是分离培养得到的最多的属; 其次是节杆菌属的菌株 26 株; 分枝杆菌属、微杆菌属、红球菌属和壤霉菌属的菌株分别为 16、15、12 和 12 株, 其他属的放线菌均不超过 10 株。以放线菌中常用的 16S rRNA 基因序列相似性 99%为阈值^[19], 255 株分离菌株可被划分为 94 个 OTUs, 包括 47 个 clusters 和 47 个 singletons, 可能代表了 94 个放线菌物种, 其中链霉菌物种 28 个(表 2)。这表明该地区土壤可培养放线菌多样性很丰富。

表 2. 分离菌株和 OTUs 的分类情况

Table 2. Classification of isolates and OTUs delineated by 99% 16S rRNA gene sequence similarity

Order	Family	Genus	No. of isolates	No. of OTUs (putative species)
Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	16	9
	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>	7	2
		<i>Rhodococcus</i>	12	4
Jiangellales	Jiangellaceae	<i>Jiangella</i>	3	1
Micrococcales	Bogoriellaceae	<i>Georgenia</i>	2	1
	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>	2	1
		<i>Agromyces</i>	12	3
	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium</i>	1	1
		<i>Microbacterium</i>	15	4
		<i>Arthrobacter</i>	26	9
		<i>Citricoccus</i>	4	2
		<i>Kocuria</i>	1	1
		<i>Promicromonospora</i>	2	2
Micromonosporales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	8	6
Propionibacteriales	Nocardioidaceae	<i>Kribbella</i>	3	1
Pseudonocardiales	Pseudonocardiaceae	<i>Actinomycetospira</i>	1	1
		<i>Lentzea</i>	2	2
		<i>Pseudonocardia</i>	9	4
		<i>Saccharothrix</i>	2	1
		<i>Streptomyces</i>	108	28
Streptosporangiales	Streptosporangiaceae	<i>Streptosporangium</i>	6	5
		<i>Nonomuraea</i>	10	4
	Thermomonosporaceae	<i>Actinomadura</i>	3	2
Total			255	94

分离菌株中, 有 13 个属、25 个 OTUs 的 29 株放线菌的 16S rRNA 基因序列与最近模式菌株的相似性低于 99%, 可能属于新种(表 3)。其中, 属于同一 OTU 的菌株 29-2 和 29-3 与另一个 OTU 的菌株 39-6 的最近模式菌株都是 *Streptomyces specialis* GW 41-1564^T, 它们与后者的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 98.18%、98.27% 和 98.82%。16S rRNA 基因系统发育分析显示, 这 3 株菌与 *Streptomyces specialis* GW 41-1564^T 在链霉菌属的进化树中聚为一个很不稳定的分支; 其中菌株 29-2 和 29-3 形成一个稳定的紧密小分支, 菌

株 39-6 虽然与它们聚在一起, 但聚簇的支持率很低(图 1); 且菌株 29-2 和 29-3 之间的序列相似性为 99.92%, 但它们与菌株 39-6 的序列相似性仅为 97.73%。表明这 3 株菌很可能代表链霉菌属的 2 个不同新种。稀有放线菌中, 属于不同 OTUs 的菌株 P015-6 和 P015-45 的最近模式菌株都是 *Lentzea violacea* IMSNU 50388^T, 它们与后者的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 98.11% 和 98.90%。16S rRNA 基因系统发育分析显示, 这 2 株菌分别与伦茨氏菌属不同的模式菌株聚簇在一起(图 2); 菌株 P015-6 与 *Lentzea jiangxiensis*

表 3. 与模式菌株的 16S rRNA 基因序列相似性低于 99% 的 25 个 OTUs 和 29 株分离菌株

Table 3. OTUs and isolates that share < 99% 16S rRNA gene sequence similarity with the nearest type strains

No.	OTU No.	Strain No.	16S rRNA gene GenBank No.	The closest type strain	16S rRNA gene sequence similarity/%
1	OTU2	45-2	KY921885	<i>Actinomadura rayongensis</i> RY35-68 ^T	98.89
2	Singleton	P798-52	KY910132	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> DSM 20117 ^T	97.85
3	Singleton	P798-55	KY922858	<i>Citricoccus yambaruensis</i> PS9 ^T	98.99
4	OTU4	P813-5-2	KY922860	<i>Citricoccus zhacaiensis</i> FS24 ^T	98.90
		P798-45	KY922856	<i>Citricoccus zhacaiensis</i> FS24 ^T	98.68
5	OTU65	42-36	KY910128	<i>Georgenia ruanii</i> YIM 004 ^T	97.04
6	Singleton	P813-21	KY910239	<i>Kocuria polaris</i> CMS 76or ^T	98.98
7	Singleton	P015-6	KY465494	<i>Lentzea violacea</i> IMSNU 50388 ^T	98.11
8	Singleton	P015-45	KY910131	<i>Lentzea violacea</i> IMSNU 50388 ^T	98.90
9	OTU8	39-5	KY921881	<i>Micromonospora coxensis</i> 2-30-b/28 ^T	98.97
10	Singleton	39-15	KY910127	<i>Micromonospora haikouensis</i> 232617 ^T	97.75
11	OTU9	P801-42	KY910181	<i>Mycobacterium arabiense</i> YIM 121001 ^T	98.44
12	Singleton	P799-14	KY910175	<i>Mycobacterium aurum</i> ATCC 23366 ^T	98.83
13	OTU36	P801-37	KY910178	<i>Mycobacterium elephantis</i> 484 ^T	98.90
		P801-38	KY910179	<i>Mycobacterium moriokaense</i> DSM 44221 ^T	98.90
14	Singleton	P801-36	KY910180	<i>Mycobacterium litorale</i> F4 ^T	98.11
15	Singleton	P799-25	KY910174	<i>Mycobacterium goodii</i> ATCC 700504 ^T	97.81
16	Singleton	P798-68	KY910173	<i>Promicromonospora umidemergens</i> 09-Be-007 ^T	98.81
17	OTU10	P798-57	KY910172	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i> YIM 16303 ^T	98.91
18	Singleton	P799-51	KY910177	<i>Pseudonocardia khuvsgulensis</i> MN08-A0297 ^T	98.91
19	Singleton	P813-19	KY910240	<i>Rhodococcus coprophilus</i> DSM 43347 ^T	98.98
20	Singleton	44-20	KY910129	<i>Streptomyces burgazadensis</i> Z1R7 ^T	95.98
21	Singleton	38-7	KY921883	<i>Streptomyces polymachus</i> T258 ^T	98.80
22	OTU24	38-11	KY910126	<i>Streptomyces pulveraceus</i> LMG 20322 ^T	98.58
		38-26	KY921882	<i>Streptomyces purpureus</i> NBRC 13927 ^T	98.90
23	OTU83	29-2	KY910123	<i>Streptomyces specialis</i> GW 41-1564 ^T	98.18
		29-3	KY922857	<i>Streptomyces specialis</i> GW 41-1564 ^T	98.27
24	Singleton	39-6	KY921884	<i>Streptomyces specialis</i> GW 41-1564 ^T	98.82
25	Singleton	P804-61	KY922859	<i>Streptosporangium album</i> DSM 43023 ^T	98.66

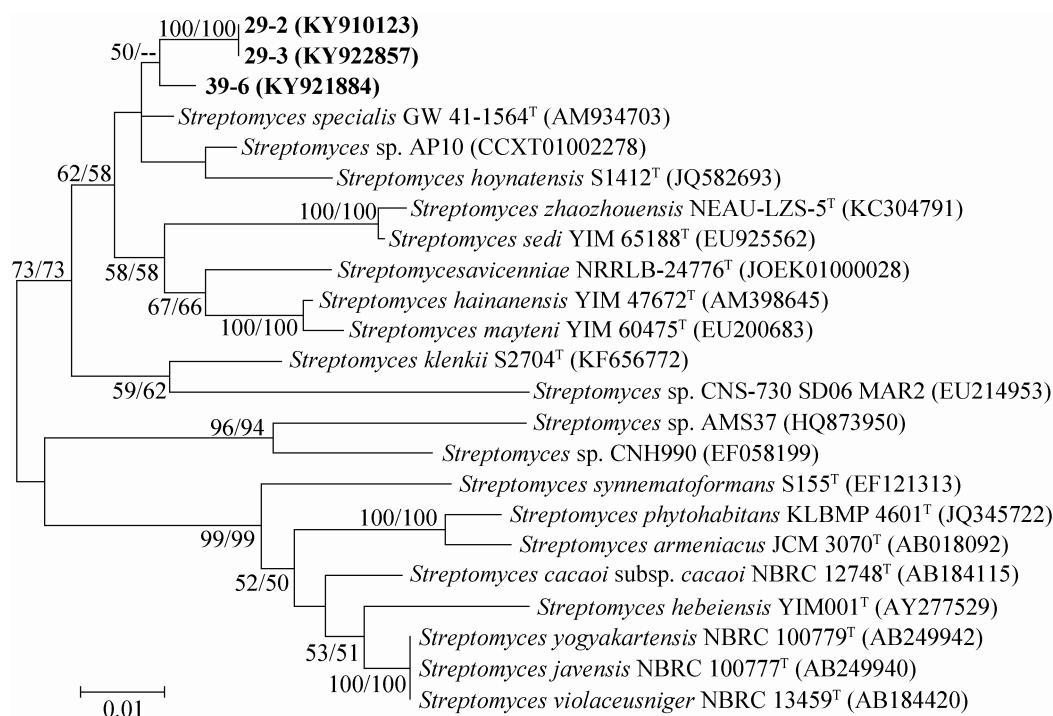


图 1. 依据 16S rRNA 基因序列构建的菌株 29-2、29-3 和 38-6 与链霉菌属相关菌株的 ML 树

Figure 1. Maximum-Likelihood tree based on 16S rRNA gene sequences showing phylogenetic relationships between isolates 29-2, 29-3 and 38-6 and related strains within the genus *Streptomyces*. Bootstrap values (percentages of 1000 replications) of the NJ and ML analyses are shown at the branch nodes before and after the backslash. Only values above 50% are given. Bar: 0.01 substitutions per site.

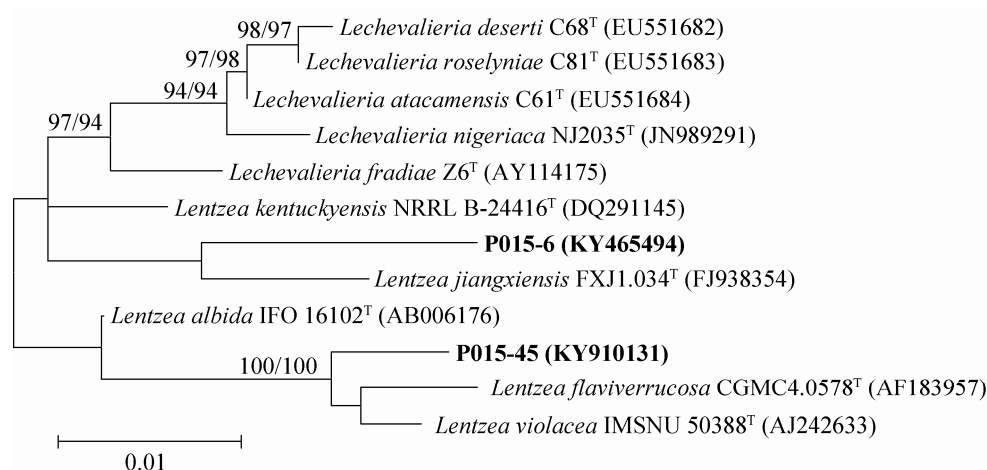


图 2. 依据 16S rRNA 序列构建的菌株 P015-6 和 P015-45 与伦茨菌属相关模式菌株的 ML 树

Figure 2. Maximum-Likelihood tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships between isolates P015-6 and P015-45 and the related type strains within the genus *Lentzea*. Bootstrap values (percentages of 1000 replications) of the NJ and ML analyses are shown at the branch nodes before and after the backslash. Only values above 50% are given. Bar: 0.01 substitutions per site.

FXJ1.034^T 形成一个很不稳定的分支, 它们序列相似性仅为 97.36%; 菌株 P015-45 与 *Lentzea flaviverrucosa* AS4.0578^T 和 *Lentzea violacea* IMSNU 50388^T 形成一个稳定的分支, 与后二者的序列相似性分别为 98.74%和 98.90%; 且菌株 P015-6 和 P015-45 之间的序列相似性仅为 97.75%。表明这 2 株菌很可能代表伦茨氏菌属的 2 个不同新种。根据上述 OTU 分析和系统发育分析结果, 这 29 株放线菌可能代表了 13 个属的至少 25 个新种, 显示所分离土壤中存在较多的新颖放线菌类群。

2.2 不同培养基分离放线菌的效果

我们用 M1–M7、1/4 GYM 和 1/4 GYM+F 共 9 种培养基对采集自青藏高原腹地的样品 1–8 进

行了分离, 不同培养基分离获得的菌株数量和多样性见表 4。其中 M1、M7 和 1/4 GYM+F 3 种培养基分离获得的放线菌菌株数量和 OTUs 数量最多。M1 分离得到放线菌 41 株, 属于 21 个 OTUs, 其中链霉菌仅 6 株; M7 分离到放线菌 30 株, 属于 18 个 OTUs, 其中链霉菌 8 株; 而 M2–M4 分离得到的都是稀有放线菌, M6 未分离得到任何放线菌。1/4 GYM+F 分离到放线菌 61 株, 属于 25 个 OTUs, 其中绝大部分为链霉菌; 而 1/4 GYM 分离得到的放线菌仅为 17 株, 属于 12 个 OTUs, 其中绝大部分也为链霉菌。相比之下, 加了藤黄微球菌发酵液的 1/4 GYM+F 培养基上获得的菌落数量明显更多, 而且菌落的多样性更为丰富(图 3)。

表 4. 各培养基对样品 1–8 中放线菌的分离情况统计

Table 4. Numbers of actinobacterial isolates obtained from samples 1–8 on each selective medium

No.	Medium	No. of streptomycetes	No. of rare actinobacteria	No. of isolates	No. of OTUs (putative species)
1	M1	6	35	41	21
2	M2	0	2	2	2
3	M3	0	16	16	9
4	M4	0	15	15	12
5	M5	4	4	8	6
6	M6	0	0	0	0
7	M7	8	22	30	18
8	1/4 GYM	12	5	17	12
9	1/4 GYM+F	45	16	61	25
Total		65	125	190	–

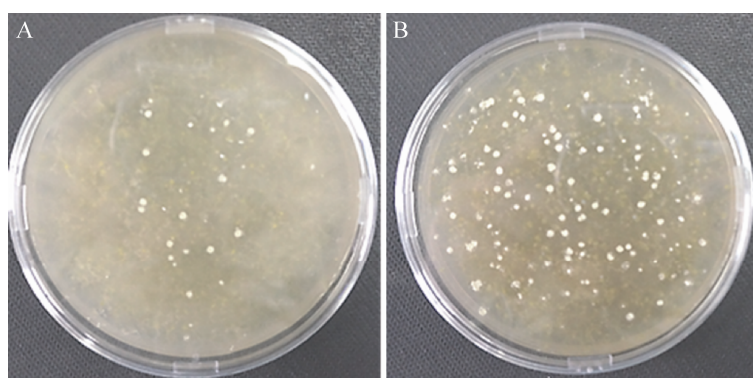


图 3. 10^{-2} 稀释度的样品 P813 涂布于 1/4 GYM (A)和 1/4 GYM+F (B)培养 14 d 后的分离平板

Figure 3. Isolation plates of 1/4 GYM (A) and 1/4 GYM+F (B) inoculated with a 10^{-2} dilution of sample P813 and incubated for 14 d.

由此可见, 藤黄微球菌发酵液明显有助于青藏高原土壤中放线菌的复苏生长和分离培养; 9 种培养基中, 1/4 GYM 和 1/4 GYM+F 比较适用于分离链霉菌, M1、M3、M4 和 M7 比较适用于分离稀有放线菌, 而 M6 不适用于分离青藏高原土壤放线菌。

3 讨论

本研究结果进一步说明青藏高原土壤可培养放线菌多样性非常丰富。Zhang 等^[8]对青藏高原 87 份土壤样品进行了大量的分离工作, 得到了分布于 16 个科、至少 22 个属的 1930 株放线菌。与之相比, 本研究的分离规模小得多, 但也得到了分布于 14 个科、23 个属的放线菌; 其中 5 个科 (Brevibacteriaceae、Bogoriellaceae、Jiangellaceae、Micrococcaceae、Mycobacteriaceae) 是文献研究中没有分离到的, 但文献报道的 7 个科 (Actinopolysporaceae、Actinosynnemataceae、Dermacoccaceae、Geodermatophilaceae、Glycomycetaceae、Kineosporiaceae、Propionibacteriaceae) 在本研究中没有分离到。由于本研究使用的培养基涵盖了文献的培养基 (M1–M7), 分离菌株在上述科分类层级上的多样性差异可能主要因为样品采集位点和数量的差异, 本研究的样品采自经度 80.86°–92.56°E、纬度 30.12°–34.56°N, 而文献样品采自经度 102.30°–108.18°E、纬度 27.50°–29.97°N 以及新疆、云南、四川地区, 两个研究的采样区域没有重叠。可见青藏高原不同地区, 尤其是前人没有探究过的地区的放线菌多样性值得研究, 更有可能发现新的类群。

不同放线菌的生长对营养需求存在差异, M1、M3、M4 和 M7 培养基所含的碳源分别为淀

粉甘油、纤维素、木糖和丙酸钠, 这些碳源可能更适合稀有放线菌的生长。其中 M1 所含的营养成分相对丰富, 故该培养基分离到的菌株数和多样性都较高。而 1/4 GYM 明显更适合链霉菌的生长, 可能因为其以葡萄糖为碳源, 且氮源也相对丰富。由此, 可以根据分离稀有放线菌或链霉菌的不同需求来选择不同的培养基。

1/4 GYM+F 培养基分离得到的链霉菌和稀有放线菌数目均是对照 1/4 GYM 培养基的 3 倍以上, 物种数目也是对照的 2 倍以上, 而且 1/4 GYM+F 分离得到的稀有放线菌姜氏菌属 (*Jiangella*) 和韩国生工菌属 (*Kribbella*) 在 M1–M7 培养基上并未分离得到。这充分说明藤黄微球菌发酵液的确能够促进放线菌的分离培养。可能是由于发酵液中含有藤黄微球菌分泌的复苏促进因子 Rpf, 促进了样品中与之近缘的其他放线菌的生长^[10–11]; 也可能是由于长期培养的藤黄微球菌死亡后细胞壁被裂解, 释放细胞壁肽聚糖成分 N-乙酰葡萄糖胺等小分子物质, 充当信号分子, 促进了样品中放线菌特别是链霉菌的发育分化和抗生素产生^[20], 使其获得了生长优势; 此外, 藤黄微球菌发酵液中也可能存在某些次级代谢产物, 在分离培养基中起到了生长因子的作用, 从而能够促进放线菌生长。具体的促进原因有待通过进一步的实验来证明, 如利用不同培养时间的藤黄微球菌发酵液进行分离培养, 检测发酵液中的 Rpf 和次级代谢产物, 以及外源添加 N-乙酰葡萄糖胺进行分离培养。

目前, 土壤中微生物的可培养率约为 0.3%^[21], 还存在大量在实验室条件下难以培养的微生物, 其中当然也包括放线菌。此外, 尽管本研究分离到的放线菌多样性较高, 但由于所用样品保持时间较长, 可能样品中一些放线菌物种在低温长时

间储存过程中丧失了生命力, 无法再分离培养, 结果并未充分体现采样地区可培养放线菌的多样性。因此, 未来需要通过更广泛的采样和基于非培养的高通量测序分析来获得青藏高原地区土壤放线菌多样性的全景, 进而通过改进选择性分离策略和方法, 有针对性地分离目前培养手段尚未获得的放线菌类群。

参考文献

- [1] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites: a personal review. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1–26.
- [2] Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 2012, 65(8): 385–395.
- [3] Schrempf H. Recognition and degradation of chitin by streptomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, 79(3): 285–289.
- [4] Goodfellow M, Williams ST. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, 1983, 37: 189–216.
- [5] Bull AT. Actinobacteria of the extremobiosphere//Horikoshi K. *Extremophiles Handbook*. Tokyo: Springer, 2011: 1203–1240.
- [6] Yan X, Xue QH, Zhu ME. Research of cell component and physiological biochemical characteristics of 23 strains from Tibet soil. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2007, 35(10): 213–218. (in Chinese)
颜霞, 薛泉宏, 朱铭莪. 西藏土壤放线菌细胞成分及生理生化特性研究. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2007, 35(10): 213–218.
- [7] Luo HL, Huang Y, Wang LM, Liu ZH, Xie JP, Hu CH. Study on population diversity and antimicrobial activity of actinomycete from acidic soil in Xizang area. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(5): 724–727. (in Chinese)
罗红丽, 黄英, 王黎明, 刘志恒, 谢建平, 胡昌华. 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.
- [8] Zhang YQ, Liu HY, Chen J, Yuan LJ, Sun W, Zhang LX, Zhang YQ, Yu LY, Li WJ. Diversity of culturable actinobacteria from Qinghai-Tibet Plateau, China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010, 98(2): 213–223.
- [9] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类. 北京: 科学出版社, 2011.
- [10] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M, Kell DB. A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(15): 8916–8921.
- [11] Ding LX, Zhang PH, Hong HC, Lin HJ, Yokota A. Cloning and expression of *Micrococcus luteus* IAM 14879 Rpf and its role in the recovery of the VBNC state in *Rhodococcus* sp. DS471. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 52(1): 77–82. (in Chinese)
丁林贤, 张萍华, 洪华嫦, 林红军, 横田明. 藤黄微球菌 Rpf 活性蛋白的制取及其对红球菌 VBNC 菌体的复苏作用. *微生物学报*, 2011, 52(1): 77–82.
- [12] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(2): 240–245.
- [13] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [14] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [15] Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 1981, 17(6): 368–376.
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [17] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335–336.
- [18] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460–2461.
- [19] Stach JEM, 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.
- [20] Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA, van Wezel GP. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Reports*, 2008, 9(7): 670–675.
- [21] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6–17. (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6–17.

Diversity of culturable actinobacteria from soils collected in Ali, Naqu and Haixi Districts on the Qinghai-Tibet Plateau

Jiao Huang^{1,2}, Bingfa Yan^{1,2}, Ying Huang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Objective] This study is aimed at studying the diversity of culturable actinobacteria in soils of the north Qinghai-Tibet Plateau and comparing the effect of different selective isolation media on the isolation of actinobacteria. [Methods] We used 9 isolation media to isolate actinobacteria from 14 soil samples collected from Ali, Naqu and Haixi districts on the Qinghai-Tibet Plateau. We added the fermentation broth of *Micrococcus luteus* to the medium to help the isolation. The isolates were identified based on the 16S rRNA gene sequences, and diversity of actinobacterial isolates were analyzed at different taxonomic levels. [Results] We isolated a total of 255 dereplicated strains, belonging to 8 orders, 14 families and 23 genera of the phylum Actinobacteria. The isolates were delineated into 94 OTUs, which corresponded to 94 putative species. Among them, at least 25 putative species were new, spanning 13 genera; and 108 strains, which contained 28 putative species, belonged to the genus *Streptomyces*, the most dominant genus of culturable actinobacteria from the soils. Addition of the *Micrococcus luteus* fermentation broth obviously increased the number and diversity of actinobacterial isolates. Diluted glucose-yeast extract-malt extract medium was suitable for the isolation of *Streptomyces*, and starch-glycerol-proline medium, sodium propionate-casein medium, etc. were suitable for the isolation of rare actinobacteria. [Conclusion] Soils of the north Qinghai-Tibet Plateau contain a high diversity of culturable actinobacteria and a number of novel actinobacterial species. Addition of the *Micrococcus lutea* fermentation broth into the isolation medium can effectively improve the isolation efficiency for actinobacteria.

Keywords: Qinghai-Tibet Plateau, culturable actinobacteria, diversity, isolation, 16S rRNA gene

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Science and Technology Foundation Project (2015FY110100)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn

Received: 19 April 2017; Revised: 2 May 2017; Published online: 15 June 2017

黄英, 博士, 研究员, 博士生导师。1991 年于华东理工大学生物工程系获学士学位; 1994 年于四川大学生物工程系获硕士学位, 并留校任助教 2 年; 1999 年于北京大学医学部生化与分子生物学系获博士学位, 随后入中科院微生物所工作; 2002 年起任副研究员, 2007 年起任研究员、博士生导师。现任微生物资源前期开发国家重点实验室副主任, 中国空间科学学会空间生命专业委员会委员, 《微生物学报》编委。主要从事放线菌系统学、生态学及天然产物发掘利用研究。已在 *Chemical Science*、*Applied and Environmental Microbiology*、*Marine Drugs*、*Applied Microbiology and Biotechnology*、*Systematic and Applied Microbiology* 等专业刊物发表 SCI 研究论文 90 余篇, 参加编著《*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*》第二版放线菌卷。

