

## 新疆哈密地区盐湖放线菌的多样性及其功能酶的筛选

曹兰兰<sup>1,2</sup>, 王芸<sup>2</sup>, 唐蜀昆<sup>3</sup>, 张评浒<sup>4</sup>, 毛培宏<sup>5</sup>, 金湘<sup>5</sup>, 王纯利<sup>1</sup>, 娄恺<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 新疆农业大学草业与环境科学学院, 乌鲁木齐 830052)

(<sup>2</sup> 新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091)

(<sup>3</sup> 云南大学微生物研究所, 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室, 昆明 650091)

(<sup>4</sup> 中国药科大学新药筛选中心, 南京 210038)

(<sup>5</sup> 新疆大学离子束生物技术中心, 乌鲁木齐 830008)

**摘要** 【目的】本研究旨在了解新疆哈密地区盐湖放线菌多样性及产功能酶的特性。【方法】采用含有 5% 与 10% NaCl 的 4 种分离培养基, 利用稀释平板涂布法对盐湖土壤样品进行分离, 通过形态特征、耐盐性实验、抑菌实验及 16S rRNA 基因测序的基础上进行系统发育学分析, 利用五种筛选培养基定性检测放线菌的产酶活性。【结果】从盐湖土壤样品中分离到 63 株放线菌, 其中中等嗜盐放线菌 47 株, 抑菌活性实验结果表明: 23 株放线菌对痢疾杆菌和/或其它病原菌有抑菌活性; 功能酶筛选结果表明: 3 株放线菌产蛋白酶、46 株产淀粉酶、14 株产酯酶、34 株产半乳糖苷酶、5 株产纤维素酶。16S rRNA 基因的系统发育学分析结果表明盐湖放线菌类群比较丰富。【结论】新疆哈密地区盐湖放线菌资源丰富, 产酶特性良好, 为开发利用极端环境微生物资源奠定了基础。

**关键词:** 盐湖; 放线菌; 多样性; 极端酶

**中图分类号:** Q938.1    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209(2009)03-0287-07

极端微生物(extremophiles)是指在极端环境下能够正常生存的微生物群体统称,它具有普通微生物不可比拟的抗逆能力,在大面积盐碱地生物改造、高温、高盐碱环境的污染治理、石油开采和清洁能源生产等领域具有巨大的应用潜力,其资源的有效利用也是促进生物技术发展的重要途径<sup>[1-2]</sup>。

嗜盐微生物是极端微生物的重要类群,到目前为止有效发表的嗜盐放线菌分布于 9 个放线菌属<sup>[3]</sup>,包括多孢放线菌属(*Actinopolyspora*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)、普氏菌属(*Prauserella*)、链单孢菌属(*Streptomonospora*)等。长期以来,由于蒸发量大

于降水量,新疆哈密地区盐湖遵循着咸水湖——盐湖(也叫卤水湖)——干盐湖的消亡规律<sup>[4]</sup>。巴里坤湖和伊吾湖已由咸水湖演化为盐湖,盛产盐和芒硝;七角井盐湖,南湖也成为干盐湖,目前对哈密地区盐湖放线菌的研究还没有相关的报道。本文研究了哈密地区盐湖中可培养放线菌的多样性以及产酶特性,为其开发利用奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** PCR 引物、PCR 常规操作试剂和酶均购自 TaKaRa 公司。刚果红、羧甲基纤

基金项目: 国家 973 项目“前期研究专项(2008CB417214)新疆特殊环境微生物重点实验室开放课题(XJYS0203-2005-01);新疆农科院青年科技创新基金(2007Q07)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

作者简介: 曹兰兰(1984),女,新疆人,硕士研究生,主要从事微生物资源与环境研究。E-mail: caolan993@163.com

收稿日期: 2008-07-28; 修回日期: 2008-12-01

维生素钠、X-Gal 购自上海生工。高压灭菌锅为上海产 YXQ-LS-75SII、高速冷冻离心机为 Eppendorf 公司 5817R 型、PCR 仪为 Eppendorf AG 22331 Hamburg、凝胶成像系统 GK-330C 购自美国伯乐公司。

**1.1.2 培养基** ①分离培养基 淀粉酪素培养基<sup>[5]</sup>、淀粉琼脂培养基<sup>[6]</sup>、淀粉-酵母膏培养基<sup>[7]</sup>、甘油-天门冬酰胺培养基<sup>[8]</sup>，每种培养基分别加 5% 与 10% 的 NaCl，pH 调至 7-8，并加入  $K_2Cr_7O_4$  (50 mg/L) 用于抑制真菌和细菌。酶活筛选的基础培养基为淀粉琼脂培养基 (5% NaCl)。筛选放线菌酯酶、纤维素酶、半乳糖苷酶、蛋白酶活性的培养基为基础培养基分别加入吐温 80 (1%)、羧甲基纤维素钠 (1%)、X-gal (2 mL/L)、干酪素 (1%)。

**1.1.3 病原菌菌株**：大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli* ATCC 25922)、肠炎沙门氏菌 (*Salmonella enteritidis* ATCC 13076)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)、费氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri* ATCC 12022)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus* CMCC (B) 28001)，菌株由中国药科大学新药筛选中心提供。

## 1.2 样品采集和菌株分离

从新疆哈密地区的伊吾湖、巴里坤湖、七角井盐湖、南湖分别采集土壤样品 4 份，车载冰箱 4 °C 保存运回实验室备用。采用传统的稀释平板涂布法对土壤样品进行分离，37 °C 培养 7~30 d。根据菌落大小、形态、颜色进行初步分离筛选并纯化，所得纯培养物制成冻干牛奶管和斜面保藏于 4 °C 备用。

## 1.3 形态观察与 NaCl、KCl 和 MgCl<sub>2</sub> 耐受实验

用淀粉琼脂培养基 (5% NaCl) 于 37 °C 条件下进行埋片培养，培养 7 d、14 d、21 d、28 d，分别取出埋片，用光学显微镜 Olympus BH-2 观察形态。NaCl、KCl 和 MgCl<sub>2</sub> 耐受实验参见文献<sup>[9-10]</sup>的方法进行操作。

## 1.4 抑菌活性实验

**1.4.1 样品制备**<sup>[11]</sup>：平板上刮取成熟的孢子，接种有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中，200 r/min，37 °C 培养 3~5 d。加入等体积无水乙醇于发酵培养液 200 r/min 振荡过夜。5000 × g 离心，取上清液。上清液经减压浓缩，冻干。

**1.4.2 抑菌活性测定**：在 96 孔无菌微量板中，每孔加入稀释好的药物 2 μL，再加入用 M-H 药敏试验专用液体培养基稀释的 0.5 个麦氏浓度的菌液 98 μL，每个样品做 3 个重复，以青霉素、链霉素、卡那霉素

等作为阳性药。同时设置空白对照，37 °C 培养观察 24 h、48 h、72 h。参考 NCCLS 的判读方法确定样品对细菌的抗菌作用<sup>[12]</sup>。

## 1.5 产酶菌株筛选

参见文献<sup>[13-14]</sup>的方法进行。

## 1.6 16S rRNA 基因 PCR 扩增和系统进化分析

参照文献<sup>[15]</sup>方法提取放线菌基因组 DNA，应用细菌 16S rRNA 基因通用引物 (正向引物：3-27F，反向引物：1429-1445R) 进行 PCR 扩增。测序所得结果用 Blast 软件在 GenBank/EMBL/DBJ 等数据库中进行相似性搜索，选取同源性比较高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象，用 Clustal\_X<sup>[16]</sup> 软件进行多重序列比对，利用 MEGA 3<sup>[17]</sup> 软件，采用邻接法 (Neighbor-Joining Method) 进行聚类分析和系统进化树构建。

## 2 结果

### 2.1 菌株分离和 NaCl、KCl 和 MgCl<sub>2</sub> 耐受实验

经纯化和初步去重后，共分离得到 63 株放线菌菌株。通过形态与培养特征观察，将菌株初步鉴定到属<sup>[18-19]</sup>。盐耐受实验结果表明 (表 1)，其中 47 株放线菌能耐受一定的 NaCl 浓度，根据 Kushner 对嗜盐菌的定义<sup>[20]</sup>，属于中等耐盐菌，其余 16 株放线菌属于弱耐盐菌。

NaCl、KCl 和 MgCl<sub>2</sub> 耐受实验结果表明 (表 1) 大部分放线菌生长所需的 Na<sup>+</sup> 完全可以被一定浓度的 K<sup>+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 所替代，如 XJ-11121，不仅能适应高浓度的 NaCl (12%)，也能适应高浓度的 KCl (15%) 和 MgCl<sub>2</sub> (30%) (表 1)。但也有少数放线菌例外，如 XJ-11063、XJ-11065、XJ-11156 能在一定浓度的 Na<sup>+</sup> 下生长，Na<sup>+</sup> 却不能被 K<sup>+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 所代替，是专性嗜 Na<sup>+</sup> 的放线菌；XJ-11104、XJ-11132、XJ-11157、XJ-11158、XJ-11164 只可在高浓度的 MgCl<sub>2</sub> (20%) 和一定浓度的 NaCl (3~20%) 条件下生长，而在只有 KCl 的基础培养基上却不能生长；XJ-11171 只在一定浓度的 KCl 和 MgCl<sub>2</sub> 条件下生长，却不能在一定浓度的 NaCl 条件下生长，这说明了放线菌对不同阳离子的适应是有选择性的。

### 2.2 产酶活性菌株的筛选

放线菌功能酶筛选结果表明：34 株产半乳糖苷酶、5 株产纤维素酶、46 株产淀粉酶、14 株产酯酶、3 株产蛋白酶；有 13 株放线菌同时产 3 种酶，有 25 株放线菌同时产两种酶 (表 1)。半乳糖苷酶与淀粉

酶产生菌分别占供试菌株的 54% 及 73% 以上,蛋白酶、纤维素酶及酯酶产生菌均较少。仅有 11 株放线菌没有筛选得到酶活,仅占供试菌株的 17.4%。

表 1 新疆哈密盐湖放线菌耐盐及产酶特征

Table 1 Characteristics of salt-tolerance and enzyme-producing of actinomycetes isolated from salt lake in Hami, Xinjiang

Strains No.	Range NaCl/%	Range KCl/%	Range MgCl <sub>2</sub> /%	Galactosidase	Cellulase	Amylase	Esterase	Protease
XJ-11061	0~10	0~20	0~25	-	-	-	-	-
XJ-11062	0~3	0~15	0~30	+	+	-	-	-
XJ-11063	0~6	0	0	-	-	-	-	-
XJ-11065	0~6	0	0	-	-	+	-	-
XJ-11068	0~6	0~5	0~20	-	-	+	-	-
XJ-11069	0~6	0~15	0~30	+	-	+	-	-
XJ-11072	0~3	0~15	0~10	-	-	+	-	-
XJ-11074	0	0	0	+	-	+	-	-
XJ-11075	0~15	0~3	0~6	-	-	-	-	-
XJ-11080	0~10	0~10	0~30	-	-	-	-	-
XJ-11086	0	0	0	+	-	+	-	-
XJ-11087	0~12	0~15	0~25	-	-	+	-	-
XJ-11088	0~1	0	0	NT	NT	NT	NT	NT
XJ-11089	0~10	0~15	0~30	+	-	+	+	-
XJ-11091	0~6	0~15	0~20	-	-	+	-	-
XJ-11098	0~6	0~15	0~30	+	-	+	+	-
XJ-11101	0~10	0~15	0~15	+	-	+	-	-
XJ-11102	0~3	0~5	0~10	+	-	+	-	-
XJ-11103	0~10	0~20	0~30	+	-	+	-	-
XJ-11104	0~6	0	0~15	+	-	+	-	-
XJ-11108	0~6	0~20	0~30	-	-	+	-	-
XJ-11109	0~12	0~5	0~15	-	-	-	-	-
XJ-11112	0~6	0~5	0~30	-	-	+	+	-
XJ-11113	0~6	0~15	0~30	+	-	-	-	-
XJ-11114	0~12	0~15	0~30	-	+	+	-	-
XJ-11116	0~6	0~10	0~25	+	-	+	-	-
XJ-11118	0~6	0~15	0~20	-	-	-	-	-
XJ-11120	0~10	0~15	0~30	-	+	+	-	-
XJ-11121	0~12	0~15	0~30	-	-	+	+	-
XJ-11123	0~6	0~5	0~20	-	-	+	-	-
XJ-11124	0~15	0~25	0~30	+	-	+	+	-
XJ-11128	0~10	0~15	0~15	-	-	+	-	-
XJ-11131	0~12	0~30	0~20	+	+	+	-	-
XJ-11132	0~6	0	0~15	-	-	-	-	-
XJ-11134	0~3	0~15	0~10	+	-	-	+	-
XJ-11135	0~12	0~15	0~15	+	-	+	+	-
XJ-11137	0~3	0~10	0~15	+	-	+	-	-
XJ-11138	0~12	0~20	0~30	+	-	+	+	-
XJ-11140	0~6	0~3	0~6	+	-	+	-	+
XJ-11146	0~6	0~10	0~15	+	-	+	-	-
XJ-11149	0~3	0~15	0~15	+	-	+	+	-
XJ-11150	0~3	0~15	0~15	+	-	+	-	-
XJ-11152	0~6	0~5	0~15	-	-	-	-	-
XJ-11154	0~12	0~30	0~30	+	-	+	+	-
XJ-11155	0~10	0~30	0~30	+	-	+	+	-
XJ-11156	0~10	0	0	+	-	+	-	-
XJ-11157	0~6	0	0~10	-	-	-	-	-
XJ-11158	0~12	0	0~30	-	-	-	+	-
XJ-11160	0~6	0~10	0~30	+	-	+	-	-
XJ-11162	0~6	0~25	0~15	-	-	+	-	+

续表 1

Strains No.	Range NaCl/%	Range KCl/%	Range MgCl <sub>2</sub> /%	Galactosidase	Cellulase	Amylase	Esterase	Protease
XJ-11164	0~3	0	0~6	-	-	-	-	-
XJ-11165	0~3	0~5	0~15	+	-	+	-	-
XJ-11166	0~3	0~5	0~20	+	-	+	-	-
XJ-11167	0~10	0~25	0~30	-	-	+	-	-
XJ-11169	0~10	0~25	0~25	+	-	+	+	-
XJ-11171	0	0~15	0~30	+	+	+	-	-
XJ-11173	0~12	0~15	0~30	+	-	+	+	-
XJ-11174	0~6	0~5	0~10	-	-	+	-	+
XJ-11176	0~12	0~15	0~15	-	-	+	-	-
XJ-11177	0~15	0~5	0~25	-	-	-	-	-
XJ-11178	0~3	0~5	0~6	+	-	+	-	-
XJ-11180	0~12	0~3	0~3	+	-	-	-	-
XJ-11181	0~3	0~10	0~6	+	-	+	-	-

+ : Positive ; - : Negative ; NT : No Data.

2.3 抑菌活性实验

抑菌实验结果表明(表 2):有 7 株菌能抑制大肠杆菌生长、23 株菌能抑制费氏志贺氏菌生长、1 株菌能抑制金黄色葡萄球菌生长、5 株菌能抑制枯草芽孢杆菌生长、6 株菌能抑制藤黄微球菌生长;能同时抑制两种或两种以上病原指示菌生长的放线菌有 8 株。没有筛选到抑制肠炎沙门氏菌和绿脓杆菌的放线菌。

表 2 新疆哈密盐湖放线菌抑菌活性

Table 2 Antibacterial activity of the actinomycetes isolated from salt lake in Hami, Xinjiang

Strains No.	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
XJ-11061	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11062	+	-	-	+	-	-	+
XJ-11063	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11065	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11068	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11069	-	-	-	-	-	+	-
XJ-11072	-	-	-	-	+	-	-
XJ-11075	-	-	-	-	-	-	+
XJ-11080	-	-	-	-	-	+	-
XJ-11086	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11087	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11089	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11091	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11092	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11098	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11101	+	-	-	+	-	-	+
XJ-11102	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11103	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11104	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11108	-	-	-	+	-	+	-
XJ-11109	+	-	-	+	-	-	-
XJ-11112	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11113	-	-	-	-	-	-	-

Strains No.	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
XJ-11114	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11116	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11118	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11120	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11121	-	-	-	+	-	+	-
XJ-11123	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11124	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11128	+	-	-	-	-	-	-
XJ-11131	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11132	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11134	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11135	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11137	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11138	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11140	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11146	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11149	-	-	-	-	-	-	+
XJ-11150	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11152	+	-	-	+	-	-	-
XJ-11154	+	-	-	-	-	-	-
XJ-11155	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11156	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11157	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11158	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11160	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11162	-	-	-	-	-	+	+
XJ-11164	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11165	-	-	-	+	-	-	+
XJ-11166	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11167	-	-	-	+	-	-	-
XJ-11169	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11171	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11173	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11174	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11177	+	-	-	-	-	-	-
XJ-11178	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11180	-	-	-	-	-	-	-
XJ-11181	-	-	-	-	-	-	-

solution concentration 2 μg/μL, + : Positive ; - : Negative ;

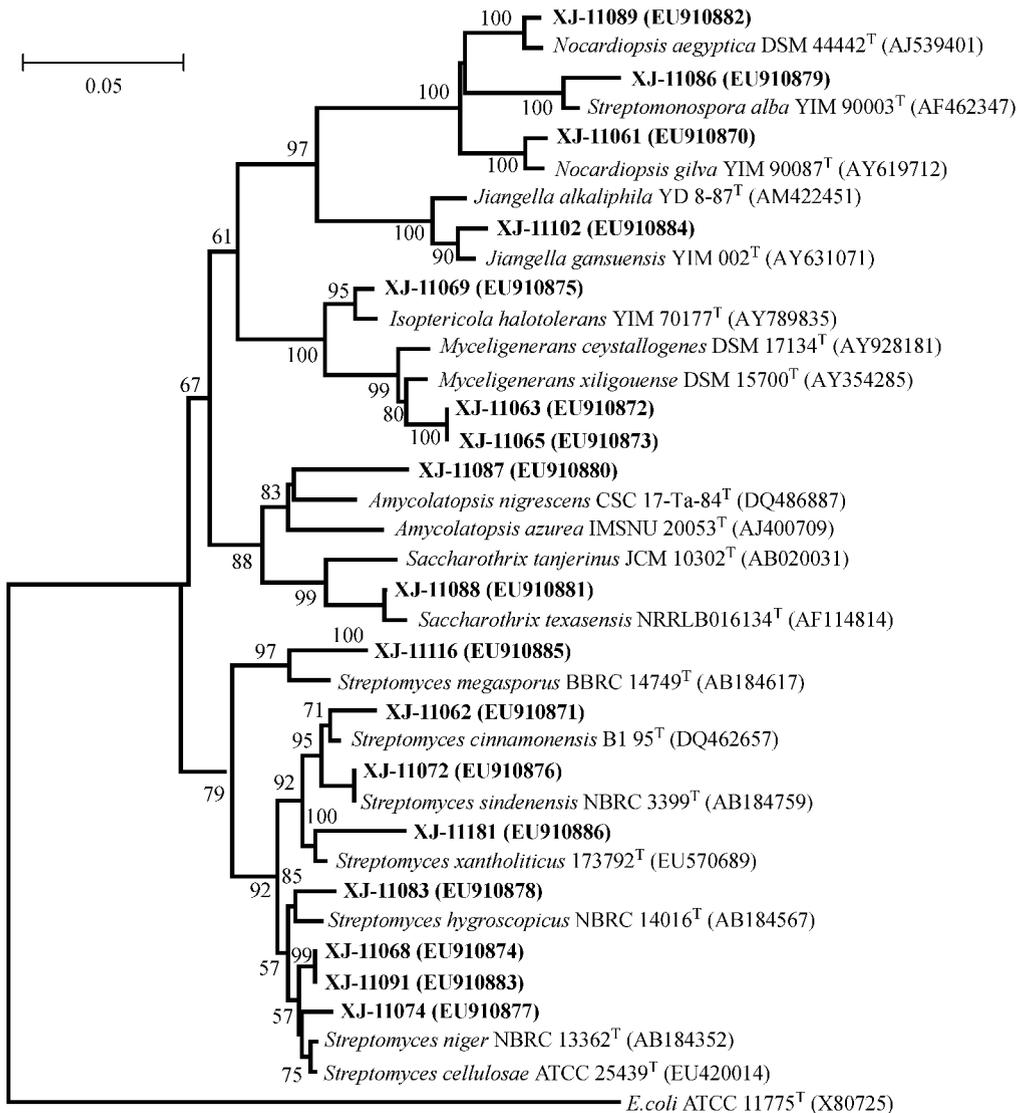
## 2.4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

本次研究所得菌株的 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号为 :EU910870-EU910886。有 8 株菌可确定为链霉菌属( XJ-11062、XJ-11068、XJ-11072、XJ-11074、XJ-11083、XJ-11091、XJ-11116、XJ-11181 ) (图 1); 菌株 XJ-11063、XJ-11065 在系统发育上与西里沟产丝菌( *Myceligeners xiligouense* )关系最近并形成独立分支,而目前该属只有 2 个有效种。XJ-11063、XJ-11065 很可能是产丝菌属的两个潜在新种,菌株 XJ-11061 和 XJ-11089 均归为拟诺卡氏菌属( *Norcardiopsis* ); 菌株 XJ-11086 归于链单孢菌属

( *Streptomonospora* )并且形成独立分支,可能是链单孢菌属的一个潜在新种,还有待 DNA-DNA 杂交来证实。XJ-11102 在系统发育地位上属姜氏菌属( *Jiangella* )并形成独立的分支,可能是姜氏菌属的一个潜在新种,目前该属只发现 2 个有效种。新种的多相鉴定工作将在后续工作中展开。

## 3 讨论

从新疆哈密地区盐湖土样中,分离得到 63 株放线菌,分布于放线菌目的 6 科 8 个放线菌属,主要的类群是链霉菌属,其次是拟诺卡氏菌属,放线菌多样



1 哈密地区盐湖放线菌系统发育进化树

Fig. 1 Phylogenetic Tree of Actinomycete Strains Isolated from Salt Lake in Hami, Xinjiang. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence using the neighbour-joining methods( Saitou & Nei, 1987 ) showing the interrelationships of actinomycete strains isolated from salt lake in Hami, Xinjiang and closed previously described species. Numbers at branching points refer to bootstrap values( 1000 resamplings; only values above 50% are shown ). The sequence of *E. coli* ATCC 11775<sup>T</sup>( X80725 ) was used as outgroup. Bar 5% sequence divergence.

性比较丰富。以往的平板分离经验表明,各类放线菌的出菌时间不一样,此次将培养条件延长至30 d,获得了一些稀有放线菌,如糖丝菌属(*Saccharothrix*)、姜氏菌属(*Jiangella*)、链单孢菌属(*Streptomonospora*)。在 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 的盐浓度耐受实验中,所分离的74.6%的放线菌属于中度耐盐菌,对 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 具有广泛的耐受性;同时多数菌株生长所需的 $\text{Na}^+$ 可以被一定浓度的 $\text{K}^+$ 和 $\text{Mg}^{2+}$ 所替代;有个别的菌是专性嗜 $\text{Na}^+$ 菌、专性嗜 $\text{K}^+$ 菌、专性嗜 $\text{Mg}^{2+}$ 菌,这与唐蜀昆对嗜盐放线菌生物学特性的研究<sup>[8]</sup>和邹静等研究 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对嗜盐放线菌生长的影响<sup>[9]</sup>所得出的结论相同。这些结果不仅揭示了放线菌一些新的生理学特性,也为设计分离和培养提供了实验依据和指导。目前国内外都在转向研究极端环境下的微生物,极端环境下存在着大量放线菌,尤其是其中的稀有放线菌能产生化学结构独特的抗生素<sup>[21]</sup>,人们希望能从这些新的放线菌资源中发现新的化合物和抗生素,促进医疗、工业和农业的发展。

抗菌活性实验所选的七种指示菌均为临床致病菌,近年来其多重耐药菌株逐渐增多,本研究所分离的放线菌对这些致病菌表现了良好的抑菌活性。对63株放线菌功能酶的研究表明,虽然盐湖自然环境恶劣,但菌株的酶活多样性仍较丰富。目前对新疆盐湖放线菌的研究主要从放线菌的分布和多样性进行研究,发现了不少新物种,如唐蜀昆从新疆盐湖及土壤中分离到的(*Haloactinospora alba*)<sup>[22]</sup>、李文均分离到的(*Streptomyces beijiangensis*)<sup>[23]</sup>等新种,但对新疆盐湖放线菌的功能研究还少有报道。本次研究结果表明新疆盐湖放线菌在筛选新抗生素及工业微生物酶制剂等领域有潜在研究价值。

嗜盐微生物的研究是一个比较新的领域,在嗜盐放线菌的研究上,我国和国外处于同一个起跑线上。现今,欧美、韩国、日本等国都在抓紧这方面的研究,从极端环境中发现大量的新物种以及特殊代谢产物。我国拥有丰富的自然资源,深入系统的研究极端环境下的微生物资源,对保护、开发、利用我国极端环境中的微生物资源具有重要的意义。而目前新疆的盐湖有逐渐萎缩和消失的趋势,湖内微生物资源亟待保护和利用。

## 参考文献

[1] 顾晓颖,李冠,吴敏. 巴里坤湖和玛纳斯湖嗜盐菌的分离及功能酶的筛选. 生物技术(*Biotechnology*), 2007, 17(3): 26-30.

- [2] 孟凡旭,吴敏,童浩萱,等. 阿牙克库木湖嗜盐菌的分离及功能酶的筛选. 浙江大学学报:理学版[*Journal of Zhejiang University (Science Edition)*], 2006, 33(6): 671-675.
- [3] 蔡蔓. 嗜盐放线菌链单孢菌属的分离、快速筛选和多相分类研究. 云南大学微生物研究所硕士学位论文, 2008.
- [4] 梁匡一. 新疆的盐湖及其地址、水文地质条件. 干旱区研究(*Arid Zone Research*), 1987, 1: 1-8.
- [5] 唐蜀昆,姜怡,娄恺,等. 嗜盐放线菌分离方法. 微生物学通报(*Microbiology*) 2007, 34(2): 390-392.
- [6] 黄路枝,胡兆农,郭正彦,等. 土壤稀有放线菌的选择性分离及其抗菌活性研究. 农药学报(*Chinese Journal of Pesticide Science*) 2007, 9(1): 59-65.
- [7] 姜怡,唐蜀昆,王永霞,等. 海洋放线菌分离方法. 微生物学通报(*Microbiology*) 2006, 33(6): 153-155.
- [8] 唐蜀昆,李文均,徐丽华,等. 嗜盐放线菌生物学特性初步研究. 微生物学通报(*Microbiology*) 2000, 30(4): 15-19.
- [9] 邹静,米琴,马永贵,等.  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度对嗜盐放线菌生长的影响. 青海农林科技(*Science and Technology of Qinghai Agriculture*) 2005(3): 1-3.
- [10] 唐蜀昆,李文均,徐丽华,等. 嗜盐放线菌生物学特性初步研究. 微生物学通报(*Microbiology*) 2003, 30(4): 15-19.
- [11] 陈义光,姜怡,李文均,等. 青海盐碱环境中具抗肿瘤活性放线菌的筛选和多样性研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*) 2007, 47(5): 757-762.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, Pennsylvania, 2005, 25(1): 1-167.
- [13] Sánchez-Porro C, Martín S, Mellado E, et al. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 9(4): 295300.
- [14] Casaburi A, Villani F, Toldrà F, et al. Protease and esterase activity of staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 3: 223-229.
- [15] 姜淑梅,张龙,戴世鲲,等. 一种简单、有效的适于PCR操作的放线菌DNA提取方法. 生物技术(*Biotechnology*) 2007, 17(1): 39-41.
- [16] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.

- [ 17 ] Kumar S , Tamura K , Nei M. MEGA 3 : Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* , 2004 , 5 :150163.
- [ 18 ] 阎逊初. 放线菌的分类与鉴定. 北京 :科学出版社 , 1992.
- [ 19 ] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组编著. 链霉菌鉴定手册. 北京 :科学出版社 , 1975.
- [ 20 ] Kushner , D. J. and Kamekura , M. ( 1988 ) physiology of halophilic eubacteria , In *Halophilic Bacteria* ed. Rodriguez-Valera , F. Vol. 1 , pp. 109 – 138. Boca Raton :CRC Press.
- [ 21 ] 李一青 , 李艳琼 , 李铭刚 , 等. 稀有放线菌产生的抗生素. 中国抗生素杂志( *Chinese Journal of Antibiotics* ) , 2008 33( 4 ) :193 – 195.
- [ 22 ] Shu-Kun Tang , Xin-Peng Tian , Xiao-Yang Zhi , et al. *Haloactinospora alba* gen. nov. , sp. nov. , a halophilic filamentous actinomycete of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2008 58 :2075 – 2080.
- [ 23 ] W. J. Li , L. P. Zhang , P. P. Xu , et al. *Streptomyces beijiangensis* sp. nov. , a psychrotolerant actinomycete isolated from soil in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2002 , 52 :1695 – 1699.

## Biodiversity and Enzyme Screening of Actinomycetes from Hami Lake

Lanlan Cao<sup>1 2</sup> , Wang Yun<sup>2</sup> , Shukun Tang<sup>3</sup> , Pinghu Zhang<sup>4</sup> , Peihong Mao<sup>5</sup> , Xiang Jing<sup>5</sup> , Chunli Wang<sup>1</sup> , Kai Lou<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Prataculture & Environment Sciences , Xinjiang Agricultural University , Urumqi 830052 , China )

(<sup>2</sup> Institute of Microbiology , Xinjiang Academy of Agricultural Sciences , Urumqi 830091 , China )

(<sup>3</sup> Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education , Yunnan Institute of Microbiology , Yunnan University , Kunming 650091 , China )

(<sup>4</sup> New Drug Screening Center , China Pharmaceutical University , Nanjing 210038 , China )

(<sup>5</sup> The center of Ion Beam Biotechnology , Xinjiang University , Urumqi 830008 , China )

**Abstract** : [ **Objective** ] In order to study the biodiversity of actinomycetes isolated from salt lakes in Hami , Xinjiang , and the characteristics of enzymes thereof. [ **Methods** ] Soil samples in salt lakes Hami were isolated with 4 isolation media containing 5% and 10% NaCl ( w/v ) by dilution-plate method. The activities of lipase , galactosidase , amylase , esterase and cellulose from isolated strains were qualitatively detected by using five selective media. Based on morphological characteristics , test of salt tolerance , antibacterial activity , enzymatic characters and sequencing of 16S rRNA gene , strains were selected for phylogenetic analysis. [ **Results** ] A total of 63 actinomycetes were isolated from salt lake in Hami , of which 47 strains were halophilic actinomycetes . The antibacterial activity results showed that 23 strains had antibacterial activity toward *Bacillus subtilis* and other pathogens. Three strains produced proteinase , 46 strains produced amylase , 14 strains produced esterase , 34 strains produced galactosidase , and 5 strains produced cellulase. Analysis of 16S rRNA gene sequence indicated relatively rich genotypic diversity among these actinomycetes. [ **Conclusion** ] There were abundant actinomycetes resources in the salt lakes in Hami , Xinjiang. The strains had very promising enzyme activities.

**Keywords** : Salt Lake ; actinomycetes ; diversity ; hydrolase ; screening

( 本文责编 :王晋芳 )

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development( 2008CB417214 ) ,

the Open Project of the Key Lab of Microorganisms in Xinjiang Specific Environment( XJYS0203-2005-01 ) and the Project of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences( 2007Q07 )

\* Corresponding author. Tel/Fax : + 86-991-4521590 ; E-mail : loukai02@mail. tsinghua. edu. cn

Received : 28 July 2008 / Revised : 1 December 2008