

新疆塔里木盆地可培养嗜盐放线菌 系统发育多样性

关统伟^{1,2} 吴晋元² 唐蜀昆² 徐丽华² 李文均² 张利莉^{1*}

- (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. 云南大学 云南省微生物研究所 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室 昆明 650091)

摘要: 应用纯培养手段和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析, 对从塔里木盆地高盐环境土壤样品中分离的 18 株可培养嗜盐放线菌多样性进行了研究。实验结果表明, 18 株嗜盐放线菌可归为 3 个科(Glycomycetaceae、Pseudonocardineae 和 Nocardiopsaceae), 在有效发表的 5 个属的嗜盐放线菌中有 4 个属的嗜盐放线菌被分离到。多数菌株属于 *Actinopolyspora* 属(38.9%)、*Nocardiopsis* 属(27.8%)和 *Streptomonospora* 属(22.2%), 是塔里木盆地高盐环境中嗜盐放线菌的优势类群。这些分离菌株中, 菌株 YIM 92370 与最近种的相似性为 92%, 在 Glycomycetaceae 科内形成一个独立的分支, 极有可能代表 Glycomycetaceae 科的一个新属。研究结果表明塔里木盆地高盐环境中存在有较为丰富的嗜盐放线菌系统发育多样性, 并且潜藏着新类型的放线菌资源。

关键词: 嗜盐放线菌, 16S rRNA, 系统发育分析, 塔里木盆地

Phylogenetic Diversity of Halophilic Actinomycetes from Hypersaline Environments in Tarim Basin of Xinjiang, China

GUAN Tong-Wei^{1,2} WU Jin-Yuan² TANG Shu-Kun²
XU Li-Hua² LI Wen-Jun² ZHANG Li-Li^{1*}

- (1. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps, Tarim University, Alar 843300)
(2. The Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract: Phylogenetic diversity of halophilic actinomycetes from hypersaline environments in Tarim basin was investigated by using culture-dependent method and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. The results showed that the eighteen isolates, which were isolated from different hypersaline soil samples belongs to three different families(Glycomycetaceae, Pseudonocardineae and Nocardiopsaceae) of the order Actinomycetales, and the most abundant and diverse isolates were within the *Actinopolyspora*(38.9%), *Nocardiopsis*(27.8%) and *Streptomonospora*(22.2%). In addition, four of the five

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30600001, No. 30660005); 人事部留学人员科技活动项目(No. 610605); 教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-06-0917); 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开放课题(No. BR0803); 新疆高校科研计划创新研究群体基金项目(No. XJEDU2005G07)

* 通讯作者: Tel: 0997-4681612; ✉: zhang63lyly@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-04-28; 接受日期: 2008-07-08

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

known genera isolates were obtained for those halophilic Actinomycetes. Interestingly, strain YIM 92370 formed one distinct clade in phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences among the family *Glycomycetaceae*, and it was noted that strain YIM 92370 is phylogenetically nearest to the genera *Glycomyces* and *Stackebrandtia*, but apparently is not a member of the two known genera or any of the other currently described actinomycetal genera. So it is proposed that the strain represents a new genus within the family *Glycomycetaceae* with 92% sequence similarity with the described species of this family. The results indicated that there was not only abundant phylogenetic diversity of halophilic actinomycetes, but also some unknown actinobacterial groups existed in hypersaline environments in Tarim basin.

Keywords: Halophilic actinomycetes, 16S rRNA, Phylogenetic analysis, Tarim basin

对于高盐环境微生物的研究, 长期以来主要集中在嗜盐古菌和嗜盐细菌方面。无论是纯培养还是免培养, 关于嗜盐放线菌的报道还不多见, 在研究理论和方法上也没有大的发展, 对高盐环境放线菌的群落组成、多样性和地理分布基本不清楚。

新疆盐碱土总面积 $8.476 \times 10^6 \text{ hm}^2$ ^[1], 被称为世界盐碱土的博物馆^[2]。塔里木盆地占有全疆土地总面积的 63.6%, 是我国最大的半封闭型内陆盆地, 为暖温带大陆型极端干旱气候。终年降水稀少, 蒸发却十分强烈, 年蒸发势 2000 mm~3400 mm, 干旱度(K)>9, 而盆地中年降水量在 45 mm 以下, 盆地中心还不到 20 mm。干旱的气候造成了大量高盐环境^[3], 如盐湖、盐山、盐碱地等。塔里木盆地又处于一个极端特殊的自然环境中, 四周被天山、昆仑山和阿尔金山所包围, 中间是世界上第二大沙漠——塔克拉玛干大沙漠, 其间还有我国最大的内陆河——塔里木河穿延而过, 形成了沙漠、戈壁、绿洲和高山相互交叉过渡, 罕见而独特的自然、地理和生态环境, 这都为我们研究塔里木盆地嗜盐放线菌创造了得天独厚的天然条件。笔者采集了塔里木盆地内各种高盐环境土壤, 利用纯培养方法以及系统发育分析来揭示塔里木盆地中嗜盐放线菌的物种多样性, 并探索到一些新的物种。该研究不仅为特殊环境下放线菌资源的开发以及高盐环境中放线菌的组成和进化历史提供宝贵的实验资料, 还将有助于为人类挖掘、保护和利用极端微生物的物种资源及基因资源提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 样品来源

2007 年 10 月, 我们从新疆塔里木盆地采集盐湖、盐山、盐碱地和人工盐场的表层土壤样品

(3 cm~20 cm), 冰袋包装, 运抵实验室后立即做纯培养分离。以上操作过程均进行严格的无菌操作, 尽量排除外源污染。

1.2 菌株分离与培养

实验中采用唐蜀昆等^[4]发表的 3 种分离嗜盐放线菌的培养基, 经过改良的 ISP2^[5]琼脂培养基和笔者设计的培养基 GW1 [干酪素 0.3 g, 甘露醇 1 g, NaHCO₃ 2 g, CaCO₃ 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, KNO₃ 2 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄·7H₂O 2 g, FeSO₄ 10 mg/L, Trace-salt 10 mg/L, Agar 20 g]。同时, 在这些培养基中补充一定比例的复合盐(盐终浓度 15%~20%)和复合维生素, 按照梯度稀释平板法, 37°C 培养 10 d~40 d, 然后挑菌纯化, 获得纯培养。根据菌株的耐盐度(NaCl%)实验, 参照 Kushner 对嗜盐菌的划分标准^[6], 对分离得到的 42 株高盐环境中的放线菌分离株, 通过耐盐度实验, 得到 18 株嗜盐放线菌的纯培养, 于牛奶管和斜面内 4°C 保存备用。同时, 将培养好的 18 株嗜盐菌送到上海生物工程有限公司进行测序。

1.3 DNA 的提取

菌株总 DNA 的提取、16S rRNA 基因的 PCR 扩增均采用 Cui 等^[7]使用的方法进行。

1.4 16S rRNA 基因测定与系统发育分析

扩增与测序采用细菌通用引物: 正向引物 PA(8-27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和反向引物 PB(1523-1504r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGC CGCA-3'), 扩增产物送到上海生物工程有限公司进行测序。根据侧序结果, 用 Blast 搜索程序从 GenBank 等公共数据库中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 用 Clustal X 进行多序列比对^[8], 系统进化矩阵根据 Kimura 模型估算^[9], 用 MEGA4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件采用邻接法 (Neighbor-Joining) 聚类分析, 并构建出系统进化树^[10]。同时, 重复取样 1000 次进行

自展值(bootstrap value)分析来评估系统进化树的拓扑结构的稳定性^[11]。定义 16S rRNA 基因序列相似性低于 98%、DNA 同源性小于 70% 作为不同的分类单元, 相似性大于 98% 的归于同一个物种来计算^[12]。

2 结果与分析

用 PA 为正向引物测定了 18 个嗜盐放线菌菌株的 16S rRNA 基因 5'端部分序列(约 700 bp 左右)。用 Blast 搜索软件从 GenBank、EMBL 和 DDBJ 等公共数据库中进行相似性搜索, 调出相似性最高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 对 1 株相似性较低的潜在新属(YIM 92370)进一步测通, 大约 1450 bp。用相关软件进行序列比对、相似性计算、进化距离矩阵计算、聚类分析和系统进化树构建等系统发育分析(进化树在此未给出), 主要结果见表 1。

实验结果表明, 这 18 个分离菌株分别属于细菌域放线菌门内的 3 个科, 包括 Glycomycetaceae、Pseudonocardineae 和 Nocardioseae。多数菌株属于 *Actinopolyspora* 菌属(38.9%)、*Nocardioseae* 菌属(27.8%)和 *Streptomonospora* 菌属(22.2%)。因此,

Actinopolyspora、*Streptomonospora* 与 *Nocardioseae* 可能是塔里木高盐环境中嗜盐放线菌的优势类群。菌株 365、368、TRM6、TRM3、TRM7、TRM4、和 TRM1 属于 *Actinopolyspora* 菌属, 与其相近菌株的相似性在 98%~99%之间; 菌株 357、362、369、414、F101 属于 *Nocardioseae* 菌属, 与关系最近的菌株的相似性较高, 均大于 99%; 菌株 374、366、418、426 属于 *Streptomonospora* 菌属, 并且分别与最近关系的菌株的相似性为 98%~100%; 而菌株 F14-1 属于 *Saccharomonospora* 菌属, 并且仅在塔里木盆地高盐环境中分离到一株该属的放线菌。

令人感兴趣的是菌株 YIM 92370, 它同最近关系的菌株 *Glycomyces arizonensis* NRRL B-16153^T (AY462042)相似性仅为 92%。以相似性大于 97% 作为同一个物种来估算, 它很可能代表一个新种或更高的分类单元。于是笔者又进一步测通了该菌株的序列, 从 GenBank 公共数据库中下载 *Glycomycetaceae* 科的全部 8 个典型种, 用 MEGA4.0 软件, 同时以 *Stackebrandtia nassauensis* DSM 44728^T (AY650268)为外群, 邻接法构建系统发育树。结果如图 1。

表 1 分离菌株同最近菌株的系统发育关系

Table 1 Phylogenetic relation to nearest neighbors of strains isolated from hypersaline environments in Tarim basin

No. of Strain (Accession number)	Closest match (GenBank accession no)	Similarity to closest match (%)
365(EU652922)	<i>Actinopolyspora</i> sp. YIM90570 (EF116934)	99
YIM 92370(EU660053)	<i>Glycomyces arizonensis</i> NRRL B-16153 ^T (AY462042)	92
357(EU652923)	<i>Nocardioseae</i> sp. 10010 (AY297775)	99
362(EU652924)	<i>Nocardioseae aegyptica</i> DSM 44442 ^T (AJ539401)	99
369(EU652926)	<i>Nocardioseae aegyptica</i> DSM 44442 ^T (AJ539401)	100
374(EU652925)	<i>Streptomonospora</i> sp. YIM 90554 (DQ667024)	99
TRM1(EU652927)	<i>Actinopolyspora salina</i> YIM 90479 ^T (DQ883811)	99
TRM3(EU652928)	<i>Actinopolyspora</i> sp. YIM 90485(EF116933)	99
TRM4(EU652929)	<i>Actinopolyspora xinjiangensis</i> YIM 90829 ^T (DQ923134)	99
TRM6(EU652930)	<i>Actinopolyspora egyptensis</i> HT371 ^T (EF198330)	98
TRM7(EU652931)	<i>Actinopolyspora salina</i> YIM 90479 (DQ883811)	99
F101(EU652932)	<i>Nocardioseae</i> sp. YIM 90039 (AY373032)	99
F14-1(EU652933)	<i>Saccharomonospora xinjiangensis</i> DSM 44391 ^T (AJ306300)	98
366(EU652934)	<i>Streptomonospora albus</i> YIM 90003 ^T (AF462347)	98
414(EU652935)	<i>Nocardioseae aegyptica</i> DSM 44442 ^T (AJ539401)	99
426(EU652936)	<i>Streptomonospora</i> sp. YIM 90544(EU442550)	99
368(EU652937)	<i>Actinopolyspora</i> sp. YIM 90570(EF116934)	99
418(EU652938)	<i>Streptomonospora</i> sp. YIM 90640(DQ667043)	100

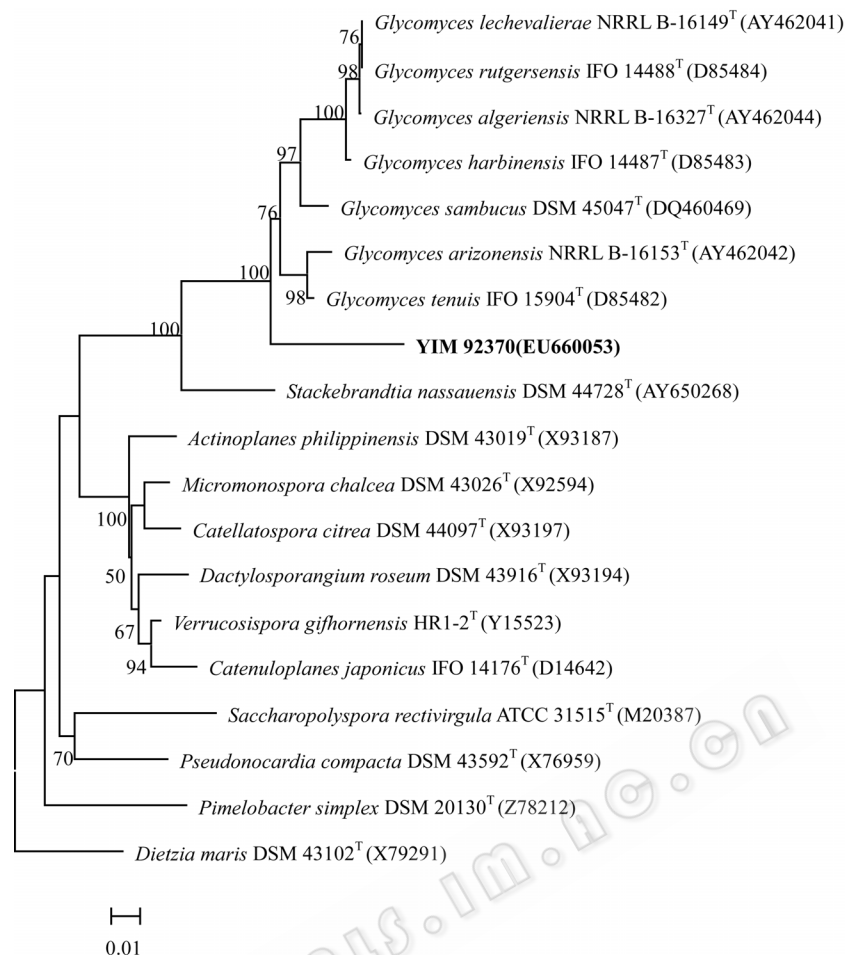


Fig. 1 Phylogenetic tree of the strain YIM 92370 and near neighbours calculated from 16S rRNA gene

Note: Sequences using Kimura's evolutionary distance method (Kimura, 1980) and the neighbour-joining method of Saitou & Nei (1987). Bar, 0.01 nucleotide substitutions per site

由图 1 可以看出, 菌株 YIM 92370 以极高的自展值在 Glycomycetaceae 科内形成一个独立的大分支, 同最近关系的典型种 *Glycomyces sambucus* DSM 45047^T (DQ460469) 的相似性仅为 92%, 在 Glycomycetaceae 科内位于一个新属的地位。当然, 对于菌株 YIM 92370 还需要通过形态特征、生理生化特征、细胞化学特征, 以及分子分类等多相分类手段, 进一步确定其分类地位。菌株 YIM 92370 的多相分类 (polyphasic taxonomy) 研究正在进行中。同时, 在塔里木盆地的高盐环境中还发现了一些耐盐的拟无枝菌酸菌属 (*Amycolatopsis*) 和纤维单孢菌属 (*Cellulomonas*) 的新类群 (结果将另文发表)。这些研究结果说明, 塔里木盆地的各种高盐环境中存在有较为丰富的嗜盐放线菌系统发育多样性, 并且潜藏着一些新类型的放线菌资源。

3 讨论

长期以来, 随着社会的发展, 许多天然环境的

不合理开发和人为的破坏, 使得一些天然环境中的极端微生物资源面临着毁灭。因此, 极端环境微生物资源的研究和开发具有紧迫性。高盐环境在世界广泛分布, 一些嗜盐微生物 (包括真核微生物和原核微生物) 在这个独特的小生境中旺盛的生长与繁衍^[13]。但不幸的是, 到目前为止, 人们也仅仅分离到为数不多的一些嗜盐放线菌物种。当前, 有效发表的嗜盐放线菌位于放线菌门 2 个科 (*Pseudonocardineae* 和 *Nocardiopsaceae*) 的 5 个属 (*Actinopolyspora*、*Prauserella*、*Saccharomonospora*、*Nocardiopsis* 和 *Streptomonospora*) 内。这是证实了前人的研究结果: 高盐环境中存在的微生物种类少^[14], 且微生物的多样性随着盐浓度的增加而降低^[15], 还是分离技术限制了人们对微生物的认识呢? 笔者利用纯培养技术从塔里木盆地高盐环境分离到目前有效发表的 4 个属的嗜盐放线菌, 但没有分离到 *Prauserella* 的嗜盐放线菌菌株。值得一提的是, 笔者采用同样的分离手段从云南盐矿中分离到了 *Prauserella* 的嗜盐放线

菌(数据未列出)。这是否暗示由于地理环境的隔离,从而造成了微生物种群的差异性。当然,这个还问题需要采用生物地理学手段进一步深入研究。菌株 YIM 92370 由于在 0~2% 的盐浓度(NaCl)中不生长(数据未列出),是一株典型的嗜盐放线菌,这也是首次在 Glycomycetaceae 科发现嗜盐放线菌,鉴于菌株 YIM 92370 代表一个新属级的分类单元,这有可能使嗜盐放线菌原来位于 2 个科的历史改写为 3 个科。这个纯培养的结果充分说明了塔里木盆地不仅存在有丰富的高盐环境类型,而且存在有丰富的嗜盐放线菌物种多样性,并潜藏着一些嗜盐放线菌新类群。据估计,人们所知道的微生物资源的种类占实有总数的不足 1%,对极端环境微生物资源更是知之甚少。因此,极端环境是发现未知微生物资源的理想之地。尽管人们很早就认识到微生物可以在高浓度的盐环境中生长,但直到 1975 年,Gochnauer^[16]才偶然发现了嗜盐多孢放线菌 *Actinopolyspora halophila*。目前,在嗜盐放线菌的研究上,欧盟国家、日本、韩国及中国基本上都处于研究起步阶段。最重要的原因是嗜盐放线菌生长慢、分离困难、发现的物种少,对它们的分类学、生理学、遗传学、生态学、适应机制的研究都不多,对其利用更是远远不够。最近,我们实验室对新疆硝尔库勒盐湖的免培养研究证明,那里存在有大量至今尚未获得纯培养的放线菌新类群,有的甚至在科一级或者更高的分类水平上^[17],对于这些尚未培养微生物是否具有特殊的功能基因更是不得而知。因此,如何把这些大量的尚未培养微生物获得纯培养就成为微生物学者所必须解决的现实问题之一,这就要求必须在嗜盐放线菌的分离方法上有所突破。因此,分离技术需要不断的创新,甚至永远创新,才能呈现一个更加崭新的微生物世界。

极端环境下的嗜盐放线菌是一类新型的、极具应用前景的微生物资源。它们均能在 10%~20% 的盐浓度下生长良好,有特殊的生理机制及特殊的代谢产物,对于揭示生物圈起源的奥秘,阐明生物多样性形成的机制,认识生命的极限及其与环境的相互作用规律等都具有极为重要的科学意义和开发价值,也是各国争夺资源和相关高新技术知识产权的一个重要领域。极端环境微生物资源同时也是特殊功能基因资源,对其研究不但能大量收集生物资源,深入了解生命的本质,更能为现代生物学研究提供丰富多样的研究材料。塔里木盆地的微生物资源是一

种非常重要的原始状态的资源,挖掘该地区特殊环境的微生物资源,实施这类资源的转化和开发,必将产生巨大的社会效益。

参 考 文 献

- [1] 新疆维吾尔自治区农业厅. 新疆土壤. 北京: 科学出版社, 1996, pp.304-336.
- [2] 文振旺. 新疆土壤地理. 北京: 科学出版社, 1965, pp. 113-115.
- [3] 金 炯. 新疆塔里木盆地的现代气候状况. 干旱区资源与环境, 1994, 9(3): 12.
- [4] 唐蜀昆, 职晓阳, 李文均, 等. 嗜盐放线菌的分离方法. 微生物学通报, 2007, 34(2): 6189-6200.
- [5] Shing EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, 16: 313-340.
- [6] Kushner DJ. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria, In: Microbial life in extreme environment, DJ Kushner(ed), Academic Press, 1978, pp. 317-368.
- [7] Cui XL, Mao P, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of family Nocardiopsaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 357-363
- [8] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The Clustal X windows interface: flexible strategi esformultiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24(4): 876-488.
- [9] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucle tide sequences. *J Mol Evol*, 1980, 16: 111-120.
- [10] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406-425.
- [11] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstap. *Evolution*, 1985, 39: 783-791.
- [12] 徐丽华, 李文均, 张玉琴, 等. 关于细菌新分类单元描述标准化. 微生物学通报, 2004, 31(6): 126-127.
- [13] Jiang HC, Dong HL, Zhang GX, et al. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(6): 3832-3845.
- [14] Oren A. The bioenergetic basis for the decrease in metabolic diversity at increasing salt concentrations: implications for the functioning of salt lake ecosystems. *Hydrobiologia*, 2001, 466: 61-72.
- [15] Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2002, 28: 56-63.
- [16] Gochnauer MB, Leppard GG, Komaratat MK, et al. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. nov., sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. *Can J Microbiol*, 1975, 21: 1500-1511.
- [17] 关统伟, 吴晋元, 张利莉, 等. 硝尔库勒湖沉积物中非培养放线菌多样性. 微生物学报, 2008, 48(7): 851-856.