

研究报告

艾丁湖可培养嗜盐菌多样性及功能酶、抗菌活性筛选

田蕾¹ 李恩源² 关统伟³ 唐蜀昆² 刘晓飞⁴ 张小平^{1*}

(1. 四川农业大学资源学院 四川 成都 611130)

(2. 云南大学 云南省微生物研究所 云南 昆明 650091)

(3. 西华大学 微生物研究所 四川 成都 610039)

(4. 四川省食品药品检验检测院 四川 成都 611731)

摘要:【目的】探究艾丁湖可培养嗜盐菌的多样性、功能酶活性以及抗菌活性,进一步了解其次级代谢产物情况,为新型生物活性物质的发掘提供依据。【方法】选用以20种糖及糖的衍生物作为唯一碳源的寡营养培养基从艾丁湖5个样点中分离得到298株嗜盐菌,根据形态特征去重复后,选取62株菌运用16S rRNA基因系统发育分析的方法研究样品中嗜盐菌的多样性;从不同类群选取22株代表菌株,采用点接法进行3种功能酶的筛选,运用平板对峙法检测代表菌株对12种病原菌的抗菌活性。【结果】从5%、10%和15%3个盐浓度中分别分得221、54和23株嗜盐菌,获得的嗜盐菌分布在9个科18个属;其中放线菌分布于4个属,细菌分布于14个属; *Nocardiopsis* 和 *Pontibacillus* 属为艾丁湖可培养嗜盐菌的优势类群,分别占17.7%和16.1%;有15株嗜盐菌相似性低于98.5%,可能为潜在新种。所选取的22株代表菌株中,分别有68.2%、22.7%和72.7%的实验菌株具有蛋白酶、淀粉酶和酯酶活性;45.5%的代表菌株对12种病原菌表现出了抗至少1种病原菌的活性,其中一株 *Nocardiopsis* 属放线菌能抗9种病原菌,表现出了广谱的抗菌活性。【结论】新疆艾丁湖土样中嗜盐菌的多样性较丰富,而且具有较好的生物活性,为后续进一步研究其次级代谢产物提供了依据。

关键词: 艾丁湖, 嗜盐菌, 多样性, 功能酶, 抗菌活性

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31270055)

***Corresponding authors:** E-mail: zhangxiaopingphd@126.com

Received: January 16, 2017; **Accepted:** April 18, 2017; **Published online** (www.cnki.net): May 18, 2017
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31270055)

***通讯作者:** E-mail: zhangxiaopingphd@126.com

收稿日期: 2017-01-16; 接受日期: 2017-04-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-18

Diversity and functional enzymes, antimicrobial activity screening of culturable halophilic bacteria from Aiding Lake

TIAN Lei¹ LI En-Yuan² GUAN Tong-Wei³ TANG Shu-Kun²
LIU Xiao-Fei⁴ ZHANG Xiao-Ping^{1*}

(1. College of Resource, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(3. Institute of Microbiology, Xihua University, Chengdu, Sichuan 610039, China)

(4. Sichuan Institute for Food and Drug Control, Chengdu, Sichuan 611731, China)

Abstract: [Objective] To explore secondary metabolites and new bioactive substances, the diversity, functional enzyme activity and antimicrobial activity of halophilic bacteria from Aiding Lake were studied. [Methods] A total of 20 sugars and sugar derivatives were selected as the sole carbon source of medium, and 298 halophilic bacteria were isolated from 5 samples of Aiding Lake. Based on the morphological characteristics, 62 representative strains were selected for 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis. Twenty-two halophilic bacteria were chosen from different species to screen functional enzyme activity and antimicrobial activity. Activity for 3 functional enzyme were tested by inoculating single colony method. Antimicrobial activity for 12 pathogenic bacteria and fungus were tested by plate confront method. [Results] There were 221, 54, 23 halophilic bacteria isolated from 5%, 10%, 15% salt concentration respectively. They were distributed in 9 families, 18 genera. Actinobacteria were distributed in 4 genera, and bacteria were distributed in 14 genera. *Nocardiosis* and *Pontibacillus* were dominant groups of culturable halophilic bacteria from Aiding Lake, comprising 17.7% and 16.1% respectively. The 16S rRNA gene sequence similarity of 15 halophilic bacteria were lower than 98.5%, which may present potential novel species. Among the 22 representative strains, 68.2%, 22.7%, 72.7% of them showed positive result for protease activity, amylase activity and asterase activity respectively. And 45.5% of the tested strains showed at least one kind of microbial activity against 12 pathogenic bacteria and fungus. Especially, one *Nocardiosis* strain exhibited extensive antagonism against 9 pathogenic bacteria and fungus. [Conclusion] The halophilic bacteria of Aiding Lake in Xinjiang has abundant diversity and good biological activity, which provides the basis for further study on secondary metabolites.

Keywords: Aiding Lake, Halophilic bacteria, Diversity, Functional enzymes, Antimicrobial activity

极端微生物因其特殊的生存环境和生理机制,近年来逐渐成为科学研究的热点,而我国特殊的地貌构造造就了高原上星罗棋布的高盐湖泊,这些自然形成的高盐度水域环境为嗜盐菌的生存提供了有利条件。为了了解嗜盐微生物独特的生理构造、遗传特性、代谢机制,探寻嗜盐微生物的潜在价值,众多科学研究者对各大盐湖展开了研究。关统伟^[1]、韩剑^[2]、刘冰冰^[3]研究了罗布泊放线菌、细菌、古菌的多样性及酶活特性等,对所用分离培养基进行了比较分析;石蓉^[4]、陈超^[5]、张正芸^[6]研究了新疆七角井盐湖放线菌、细菌的多样性和功能酶特性以及次生代谢产物,并对 PKS 基因进行了筛

选^[7],从中发现了丰富的菌种资源及新物种。能产生抗生素及其他生物活性物质的放线菌,一直以来都被作为重要微生物资源进行研究,而处于极端环境中的放线菌更是不容小觑,有望从中筛选出新型生物活性物质。

艾丁湖湖面海拔为-154.4 m,是我国的最低洼地,也是世界第二低地,整个吐鲁番盆地水系最后都汇于此处,湖水矿化度达 210 g/L,独特的地理位置和离子组分使其微生物资源具有极大的研究意义^[8]。2007 年唐蜀昆^[9]对艾丁湖放线菌资源进行了研究,并建立了适合新疆盐湖放线菌分离的方案。张芸娇^[10]以 Biolog 板为载体,对艾丁湖微生

物群落碳源利用进行评价, 并根据其代谢特征预测有效底物, 有效指导了分离菌纯培养。贾鰻^[11]在张芸娇^[10]研究的基础上运用高通量测序、Biolog 板以及纯培养的方法对艾丁湖放线菌资源进行了更深入的挖掘, 发现了不少新属和新种。从以上研究结果可看出艾丁湖蕴含丰富的放线菌资源, 具有巨大的研究价值, 研究者们建立的方法也十分有效, 值得在其基础上继续对艾丁湖的微生物资源进行探索。

因此, 以 20 种具有唯一碳源的寡营养培养基对采自新疆艾丁湖的土样进行嗜盐菌的分离, 并对所分离得到菌株的遗传多样性、功能酶活性及抗菌活性进行分析, 为后期次生代谢产物的研究及新化合物的分离奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料: 采自新疆艾丁湖不同样点的 5 个土样 D1、D2、D3、D4、D5 于 4 °C 保存备用, 具体样点信息见表 1。

1.1.2 主要试剂和仪器: 细菌通用引物 PA、PB, 生工生物工程(上海)有限公司合成; *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、pEASY-T1 Cloning Kit 克隆载体、Trams1-T1 感受态细胞, 北京全式金生物技术有限公司; 各种糖及糖的衍生物, 上海源叶生物技术有限公司和北京酷来搏科技有限公司。超净工作台, 苏净集团安泰公司; 电泳仪, Bio-Rad 公司; PCR 仪, 德国 Biometra 公司; 恒温培养箱, 上海精宏试验设备有限公司。

1.1.3 培养基: (1) 分离培养基: 以 20 种糖及糖的衍生物作为唯一碳源的寡营养培养基作为实验

组, CCMS 培养基^[11]作为阳性对照组, 超纯水琼脂糖培养基作为阴性对照组, 盐浓度均分别设置为 5%、10%和 15%, 以分子实验用琼脂糖代替琼脂作凝固剂, 用超纯水配制, 以此来减小由琼脂杂质及自来水杂质带来的干扰。3 种培养基的具体配方如下: 基础培养基(g/L): KNO₃ 0.20, MgSO₄·7H₂O 0.05, CaCO₃ 0.02, FeSO₄ 0.01, KCl 20.00, MgCl₂ 30.00, NaCl 50.00/100.00/150.00, 琼脂糖 15.00, pH 7.5, 唯一碳源 5.00 (20 种碳氮源如下: 低聚果糖, D-甘露醇, 水杨苷, D-纤维二糖, D-海藻糖, L-阿拉伯糖, α-甲基-D-甘露糖苷, 木糖醇, D-果糖, D-木糖, D-半乳糖, 水苏糖, D-甘露糖, 蔗糖, 麦芽糖, α-D-葡萄糖, α-D-乳糖, α-甲基-D-葡萄糖苷, D-山梨醇, 肌苷)。CCMS 培养基(g/L): 纤维素 10.00, 干酪素 0.30, KNO₃ 0.20, MgSO₄·7H₂O 0.05, CaCO₃ 0.02, FeSO₄ 0.01, KCl 20.00, MgCl₂ 30.00, NaCl 50.00/100.00/150.00, 琼脂糖 15.00, pH 7.5^[11]。超纯水琼脂糖培养基(g/L): 琼脂糖 15.00, NaCl 50.00/100.00/150.00, pH 7.5。

(2) 功能酶筛选培养基: 基础培养基为 GTY 培养基^[5]。蛋白酶筛选培养基: 在最适盐浓度的基础培养基里加入 1%脱脂牛奶; 淀粉酶筛选培养基: 在最适盐浓度的基础培养基里加入 1%可溶性淀粉; 酯酶筛选培养基: 在最适盐浓度的基础培养基里分别加入 1%的吐温-20、吐温-40、吐温-60、吐温-80。

(3) 病原菌筛选培养基: PDA 培养基^[12], LB 培养基^[13]。

表 1 艾丁湖 5 个土样信息

Table 1 Information of five samples from Aiding Lake

编号 Number	纬度 Latitude	经度 Longitude	生态环境 Ecological environment
D1	N42°41'53.8"	E89°20'26.6"	盐沼内的小河沟泥样
D2	N42°40'42.0"	E89°21'98.6"	干盐沼地
D3	N42°40'21.5"	E89°22'84.9"	小盐池
D4	N42°38'55.7"	E89°16'05.9"	湖底泥
D5	N42°38'47.9"	E89°15'84.4"	湖边大节节草土样

1.1.4 病原菌：植物病原菌：黄瓜枯萎病菌 (*Cucurbitur fusarium*)、稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*)、烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*)、小麦赤霉菌 (*Gibberella saubinetii*)、玉米弯孢菌 (*Curvularis lunata*)、腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、棉柱隔孢菌 (*Ramularia areola* Atk.)；人类和动物病原菌：大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、白色念珠菌 (*Gibberella saubinetii*) 由云南省微生物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 嗜盐菌的分离：将 5 g 土样加入 45 mL 盐浓度为 10% 的无菌水中，37 °C、200 r/min 培养 0.5 h，采用梯度稀释法使最终稀释度为 10^{-2} ，吸取 150 μ L 土壤混悬液涂布，各处理重复 3 次。置于 37 °C 培养 4 周，记录分离平板上的菌落长出情况，根据菌落形态特征在同一分离平板内去除重复后，挑取单菌落在 GTY 平板上划线纯化，确定菌落为纯菌后，再转入斜面、牛奶管和甘油管保藏。

1.2.2 16S rRNA 基因的系统发育分析：采用 Chelex-100 法^[14-16]提取嗜盐菌基因组 DNA，16S rRNA 基因序列的扩增选用细菌通用引物 PA 和 PB^[17]，序列如下：PA：5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3' (对应于 *Escherichia coli* 的 7-24)；PB：5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' (对应于 *Escherichia coli* 的 1 540-1 522)。25 μ L PCR 反应体系：DNA 模板 0.5 μ L，dNTPs (10 mmol/L) 2 μ L，PA 和 PB (10 mmol/L) 各 0.5 μ L，EasyTaq (5 U/ μ L) 0.15 μ L，ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 反应条件：94 °C 10 min；94 °C 0.5 min，55 °C 0.5 min，72 °C 1.5 min，32 个循环；72 °C 10 min。PCR 扩增后用 0.8% (质量体积比) 的琼脂糖凝胶电泳进行分析，扩增片段大小为 1 500 bp 左右。将扩出的 PCR 产物送生工生物工程(上海)有限公司进行测序。测序所得到的 16S rRNA 基因序列，利用 GenBank、EzBiocloud 服务器进行在线的相似性分析^[5]，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，使用 BioEdit^[17]、ClustalX^[18] 软件进行序列相似性分析和比对，最后通过 MEGA 5.0^[19] 的邻接法 (Neighbor-Joining)^[20] 进行系统发育进化树的构建。

1.2.3 酶活检测：点接^[21]实验菌株于蛋白酶、淀粉酶、酯酶筛选培养基上，37 °C 培养 5 d。蛋白酶和酯酶筛选结果可直接用肉眼观察，淀粉酶筛选结果需滴加 1% 的碘化钾溶液后，观察并记录水解圈的产生情况，酶活水解圈最终记录值取 3 次测量平均值。

1.2.4 抗菌活性检测：将所有嗜盐菌接种于 GTY 固体培养基，于 37 °C 培养 5 d；病原真菌接种于 PDA 培养基，28 °C 培养 5 d 待用；病原细菌接种于 LB 液体培养基，37 °C、250 r/min 培养 12 h 待用。

(1) 病原细菌的检测^[22]：取 100 μ L 菌悬液均匀涂布于 LB 培养基上，再用直径为 5 mm 的打孔器将生长良好的嗜盐菌菌株制成圆形琼脂块，将有菌面朝下置于距离平板中央 2.5 cm 的 4 个方向，37 °C 培养 1 d 后，测定供试菌的抑菌圈大小，抑菌圈最终记录值取 3 次测量平均值。

(2) 病原真菌的检测^[23]：采用平板对峙法^[18,24]对代表菌株的抗菌活性进行筛选。用 5 mm 的打孔器将培养好的病原真菌和嗜盐菌制成带菌落的琼脂块，病原菌放于 PDA 培养基中央，供试菌株放在各病原菌 4 个方向等距的 2.5 cm 处，标记好菌株编号，并另做病原菌的空白对照，28 °C 培养 7 d 测定抑菌圈大小，抑菌圈最终记录值取 3 次测量平均值。

2 结果与分析

2.1 艾丁湖土壤可培养嗜盐菌的多样性

从艾丁湖 5 个土样中共分离到 298 株嗜盐菌，经形态特征观察后除去重复菌株，选取 62 株菌进行 16S rRNA 基因测序 (部分菌株分离信息见表 2)，并用邻接法构建系统发育树 (图 1)。62 株菌

表 2 22 株代表菌株分离情况统计
Table 2 Isolation result of 22 representative strains

菌株编号 Strain number	碳源 Carbon sources	NaCl (%)	分离土样 Sample	最相近的种 Closest species	相似性 Similarity (%)
YIM 98039	蔗糖	5	D4	<i>Halobacillus karajensis</i> DSM 14948	100.00
YIM 98017	蔗糖	5	D1	<i>Aquibacillus albus</i> YIM 93624	99.80
YIM 98016	D-半乳糖	5	D1	<i>Marinobacter guineae</i> M3B	97.62
YIM 98026	低聚果糖	5	D1	<i>Halomonas qijiaojiangensis</i> YIM 93003	99.80
YIM 98032	D-半乳糖	5	D1	<i>Marinobacter guineae</i> M3B	96.49
YIM 98030	水杨苷	5	D2	<i>Marinobacter lipolyticus</i> SM19	98.81
YIM 98023	α -甲基-D-甘露糖苷	5	D1	<i>Nitratireductor shengliensis</i> 110399	97.36
YIM 98046	D-山梨醇	10	D4	<i>Virgibacillus olivae</i> E308	96.07
YIM 98045	α -甲基-D-甘露糖苷	5	D3	<i>Halobacillus salsuginis</i> JSM 078133	99.81
YIM 98088	水苏糖	5	D5	<i>Streptomyces radiopugnans</i> R97	99.64
YIM 98077	D-木糖	5	D5	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> DSM 43111	98.41
YIM 98052	蔗糖	5	D5	<i>Nocardiopsis alba</i> DSM 43377	98.40
YIM 98007	水杨苷	10	D1	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	99.69
YIM 98013	D-山梨醇	5	D2	<i>Nocardiopsis rosea</i> YIM 90094	97.63
YIM 98034	水苏糖	5	D2	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925	100.00
YIM 98015	水苏糖	5	D2	<i>Bacillus sonorensis</i> NBRC 101234	99.24
YIM 98001	α -甲基-D-葡萄糖苷	10	D4	<i>Gracilibacillus thailandensis</i> TP2-8	96.84
YIM 98009	水苏糖	10	D1	<i>Pontibacillus marinus</i> BH030004	99.13
YIM 98006	水苏糖	5	D4	<i>Halobacillus yeomjeoni</i> MSS-402	98.54
YIM 98003	α -甲基-D 葡萄糖苷	10	D4	<i>Marinobacter lacisalsi</i> FP2.5	98.80
YIM 98028	CCMS	10	D1	<i>Aquisalimonas halophila</i> YIM 95345	100.00
YIM 98042	蔗糖	5	D4	<i>Halobacillus campisalis</i> ASL-17	97.38

分布在 9 个目 9 个科 18 个属(图 2) 31 个不同种, 其中放线菌分布于 4 个属(*Kocuria*、*Amycolatopsis*、*Streptomyces*、*Nocardiopsis*) 1 个亚属(*Nocardiopsis dassonvillei*) 7 个不同种; 细菌分布于 14 个属(*Alteribacillus*、*Aquibacillus*、*Bacillus*、*Anaerobacillus*、*Gracilibacillus*、*Halobacillus*、*Lentibacillus*、*Pontibacillus*、*Tenuibacillus*、*Virgibacillus*、*Nitratireductor*、*Marinobacter*、*Aquisalimonas*、*Halomonas*) 24 个不同种。*Nocardiopsis* 和 *Pontibacillus* 属为艾丁湖可培养嗜盐菌的优势类群, 分别占 17.7%和 16.1%; 其次为 *Gracilibacillus*、*Marinobacter*、*Bacillus* 属, 分别占 11.3%、11.3%和 9.7%。其中有 15 株嗜盐菌相似性低于 98.5%, 可能为潜在新种。结果表明, 艾丁湖可培养嗜盐菌不仅多样性丰富, 还可能蕴藏着

新的菌种资源。

2.2 不同盐浓度的分离效果及类群分析

嗜盐菌分离中, 所有土样长出的菌株数量在盐浓度上都呈现 5%>10%>15%这一现象, 其中 5%盐浓度分离得到 221 株(74.2%), 10%盐浓度分离得到 54 株(18.1%), 15%盐浓度仅分离得到 23 株(7.7%)。说明能耐高盐浓度的菌相对较少, 中度嗜盐菌占绝大多数。从不同盐浓度分离得到的菌株类群来看(图 3), 5%盐浓度分离得到的类群最多, 分布于 12 个属, 其中 *Nocardiopsis* 属数量最多, 占 19.5%; 10%和 15%盐浓度分别分离得到 9 个属和 4 个属, 两者的优势菌群均为 *Pontibacillus*, 分别占 26.7%和 66.7%。综上可见, 不同盐浓度所分离菌株的数量和种属均不同, 且有较大差异, 5%盐浓度得到的嗜盐菌不仅数量多, 而且多样性丰富, 分离效果远胜于其他两个盐浓度。

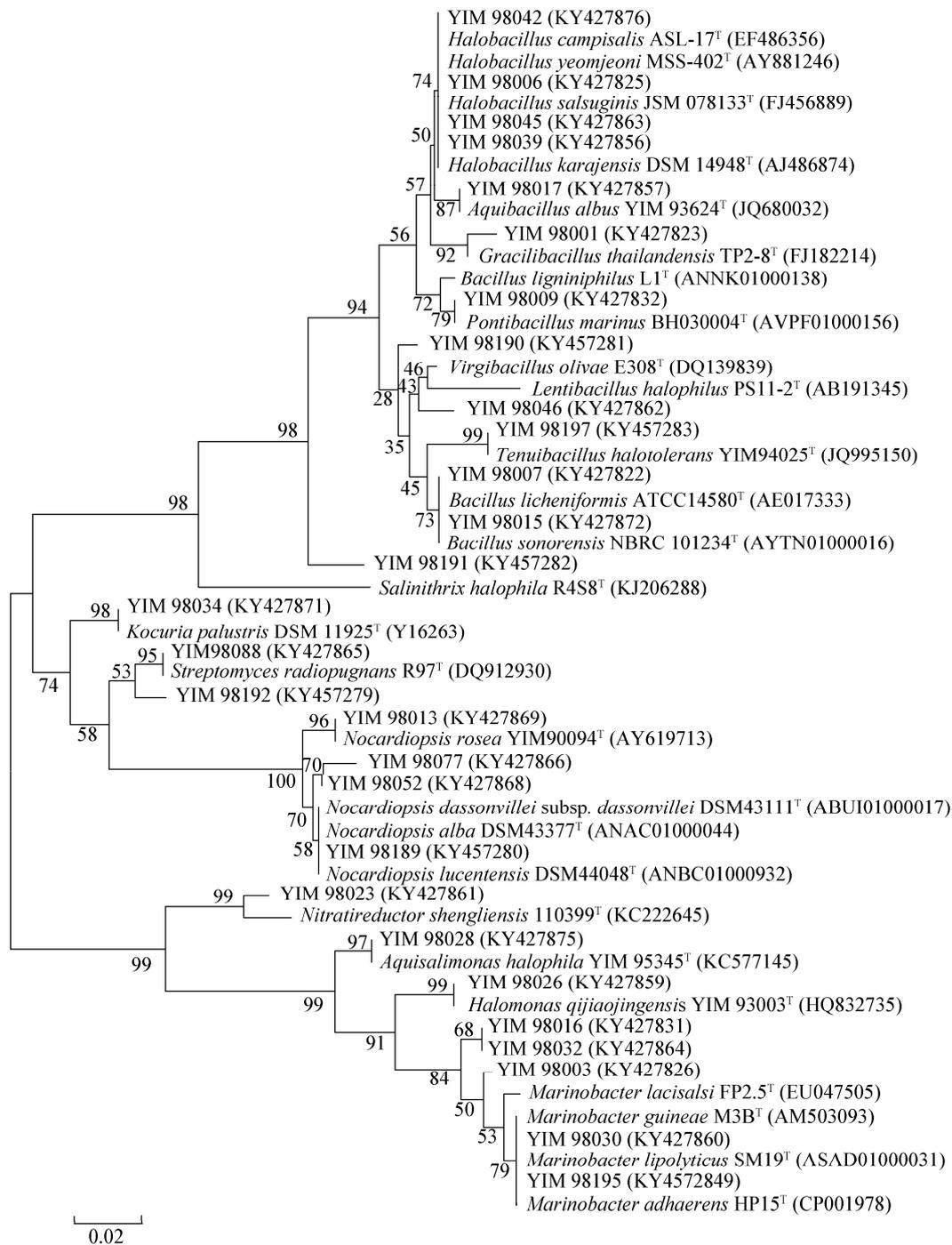


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建艾丁湖可培养嗜盐菌之间的系统发育树

Figure 1 Neighbour-Joining phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences from culturable halophilic bacteria in Aiding Lake

注：括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号；分支点上的数值为 1 000 次 Bootstrap 分析所得值，仅显示大于 50% 的值；标尺 0.02 为进化距离。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those reference strains and screened strains. Bootstrap values >50% based on 1 000 replications are shown at branch nodes. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide positions.

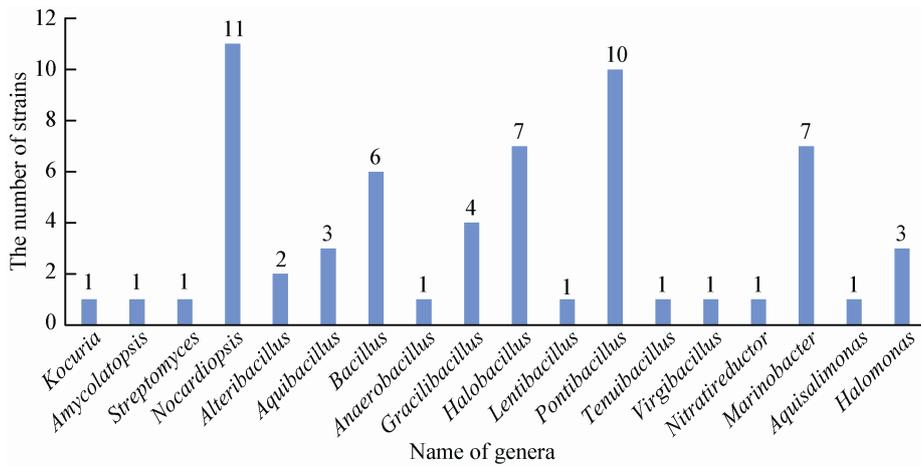


图2 所分离到嗜盐菌的类群分布

Figure 2 The genera distribution of halophilic bacteria isolated from samples

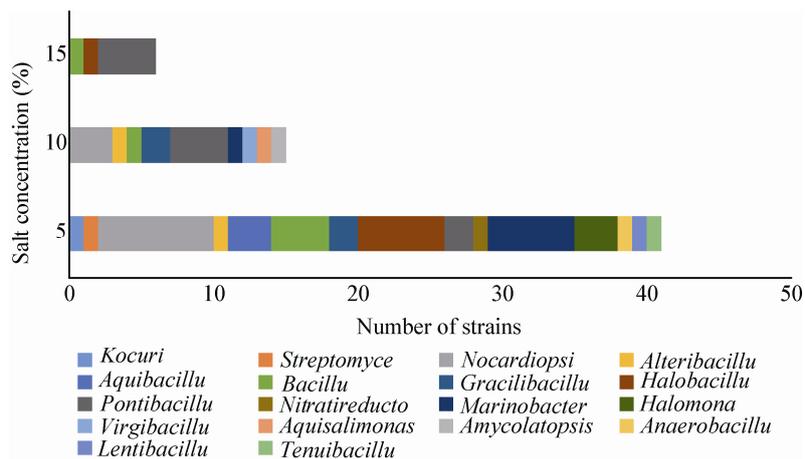


图3 不同盐浓度所分得嗜盐菌的类群及数量分布

Figure 3 The distribution of halophilic bacteria isolated from different salt concentration

2.3 不同碳源培养基的分离效果

就不同碳源分离情况而言(图4), 5个土样在以肌苷、水苏糖、CCMS、半乳糖、蔗糖、甘露醇、 α -甲基-D-甘露糖苷为唯一碳源的培养基上均有菌落长出; 以果糖、甘露糖和海藻糖为唯一碳源的培养基没有长出任何菌落。20种碳源中, 水苏糖和肌苷的分离效果最好, 分别分离到42株(14.1%)和36株(12.1%)嗜盐菌; 其次为半乳糖、山梨醇、水杨苷、蔗糖; 作为阳性对照的CCMS培养基分离效果也较

好, 略次于以半乳糖为唯一碳源的培养基。

从不同培养基分离到的种属分布来看, 以水苏糖作碳源的培养基分离的类群最多, 共16个属, *Pontibacillus*为里面的绝对优势菌群, 占比43.8%; CCMS培养基次之, 分离到11个属。由此可见, 以水苏糖作碳源的培养基分离到的嗜盐菌不仅数量多而且多样性丰富, 效果优于其他碳源, 同时也再次印证了CCMS培养基对于分离新疆高盐环境嗜盐菌是极为有效的。

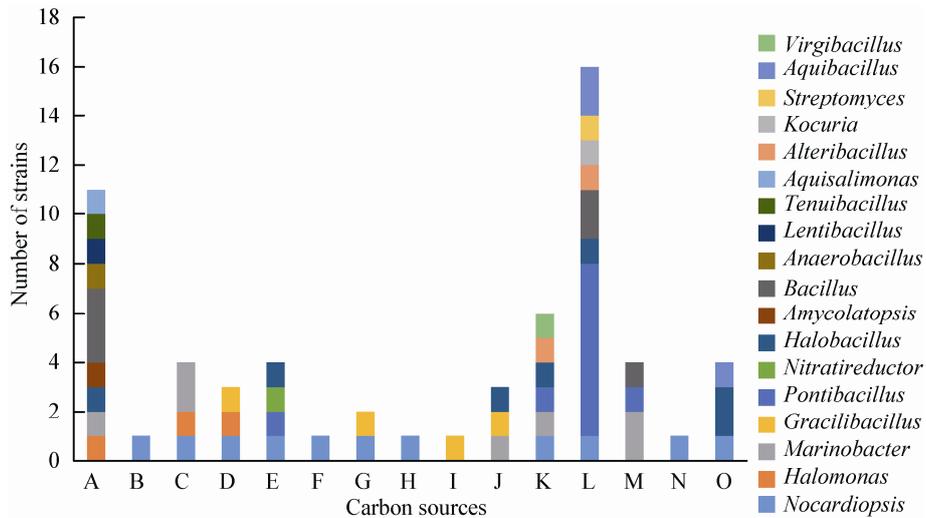


图 4 不同碳源培养基所分得嗜盐菌的类群及数量分布

Figure 4 The distribution of halophilic bacteria isolated from different carbon sources mediums

注: A: CCMS; B: 阿拉伯糖; C: 半乳糖; D: 低聚果糖; E: 甘露糖苷; F: 肌苷; G: 麦芽糖; H: 木糖; I: 葡萄糖; J: 葡萄糖苷; K: 山梨醇; L: 水苏糖; M: 水杨苷; N: 纤维二糖; O: 蔗糖.

Note: A: CCMS; B: L-arabinose; C: D-galactose; D: Fructo oligosaccharides; E: α-methyl-D-mannoside; F: Inosine; G: Maltose; H: D-xylose; I: α-D-glucose; J: α-Methyl-D-glucoside; K: D-Sorbitol; L: Stachyose; M: Salicin; N: Cellobiose; O: Sucrose.

2.4 不同样点的分离效果及类群分析

不同土样的分离情况差异较大(图 5), D5 土样无论分离的菌株总数还是长出的丝状放线菌数都是 5 个土样中最多的, 而且放线菌均为 *Nocardioptis*; 而 D3 土样的分离效果最差, 分离的菌株数甚至不及 D5 土样的 1/5。

对各个土样的种属统计结果表明, D5 土样所分离的嗜盐菌类群最丰富, 共 9 个属; D4

与 D1 土样次之, 均分离到 8 个属; D3 土样的多样性最差, 只分离到 4 个属。 *Nocardioptis*、 *Halobacillus*、 *Pontibacillu* 分别为 D5、 D4、 D1 土样的优势菌群, 占比为 50%、 31.2%和 40%。由此可见, D5 土样无论分离的菌株数量还是多样性都是 5 个土样里最好的, 而 D3 土样效果最差, 由此说明采样环境对嗜盐菌的分离结果影响较大。

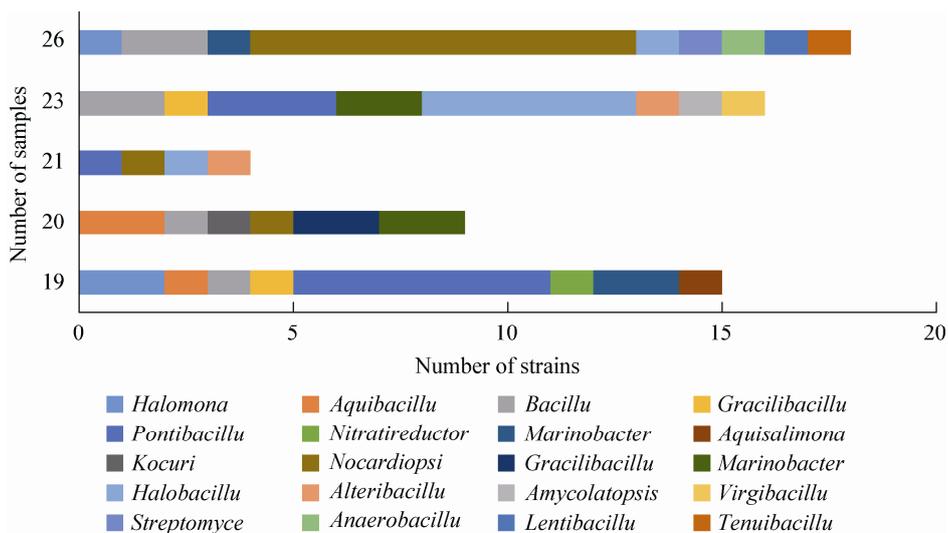


图 5 不同样点所分得嗜盐菌的类群及数量分布

Figure 5 The distribution of halophilic bacteria isolated from different samples

2.5 功能酶活性的筛选

根据测序结果, 从不同的类群选取 22 株嗜盐菌进行功能酶活性筛选, 有 19 株嗜盐菌具有至少 1 种功能酶活性, 分布于 11 个属。其中具有蛋白酶活性的有 15 株, 酶活性菌株检出率为 68.2%; 具有淀粉酶活性的有 5 株, 酶活性菌株检出率为 22.7%; 具有酯酶活性的有 16 株, 酶活性菌株检出率为 72.7%。3 株嗜盐菌同时具有 3 种酶活性, 4 株同时具有蛋白酶和淀粉酶活性, 13 株同时具有蛋白酶和酯酶活性, 3 株同时具有淀粉酶和酯酶活性(表 3)。YIM 98007 和 YIM 98052 的蛋白酶活性最高, 水解圈半径均在 7 mm

以上; YIM 98030 的淀粉酶活性最强, 活性圈半径接近 10 mm; YIM 98032 在酯酶活性筛选中表现突出, 对吐温-20 和吐温-40 表现出的活性都是所有代表菌株中最高的; YIM 98006 和 YIM 98017 则分别对吐温-60 和吐温-80 产生较强的酯酶活性, 活性圈半径高达 15.4 mm 和 11.9 mm。而这些功能酶活性较强的菌株和具有多种产酶能力的菌株主要分布在 Bacillaceae 科及 *Marinobacter*、*Nocardiopsis*、*Streptomyces* 属, 其中, 57.9% 的产酶菌株都属于 Bacillaceae 科。综上所述, 艾丁湖嗜盐菌功能酶活性较好, 且产酶能力存在着数量和种群上的差异。

表 3 功能酶活性筛选结果
Table 3 The screening results of functional enzymes activity

菌株编号 Strain No.	蛋白酶活性圈半径 Radius of protease activity circle (mm)	淀粉酶活性圈半径 Radius of amylase activity circle (mm)	酯酶活性圈半径 Radius of asterase activity circle (mm)			
			吐温-20	吐温-40	吐温-60	吐温-80
			Tween-20	Tween-40	Tween-60	Tween-80
YIM 98045	3.9	1.9	-	-	-	2.7
YIM 98046	0.7	-	2.5	2.2	4.4	6.4
YIM 98023	1.2	-	0.9	2.8	4.9	8.0
YIM 98039	1.6	-	0.8	0.9	-	9.7
YIM 98017	1.2	-	4.2	5.3	-	11.9
YIM 98032	1.5	-	8.3	9.8	2.2	4.9
YIM 98016	1.3	-	2.0	2.0	2.7	6.5
YIM 98007	7.6	2.0	-	2.4	-	-
YIM 98052	7.5	-	-	-	-	-
YIM 98015	3.7	5.0	-	4.3	1.8	1.5
YIM 98042	5.0	-	-	-	-	1.2
YIM 98077	4.7	1.2	-	-	-	-
YIM 98088	1.5	-	-	-	3.2	-
YIM 98034	-	-	3.2	1.6	5.3	3.8
YIM 98006	-	-	2.3	3.0	15.4	4.2
YIM 98030	-	9.9	-	-	-	-
YIM 98001	2.7	-	2.2	2.4	1.5	0.2
YIM 98003	-	-	-	-	1.2	-
YIM 98009	3.1	-	2.0	-	1.1	2.0

注: -: 无活性。

Note: -: Negative.

2.6 抗菌活性的筛选

抗菌活性筛选结果表明：22 株嗜盐菌中，10 株代表菌株(45.5%)对 12 种病原菌表现出了抗至少 1 种病原菌的活性，其中 2 株为嗜盐细菌，8 株为嗜盐放线菌，分别占嗜盐细菌和嗜盐放线菌总数的 40.0%和 47.1%。3 株嗜盐菌具有抗 3 种及以上病原菌的活性，其中 YIM 98046 为嗜盐细菌，YIM 98088 和 YIM 98013 为嗜盐放线菌。YIM 98013 尤其能抗稻瘟病菌、伤寒沙门氏菌、烟草赤星病菌、黄瓜枯萎病菌、棉柱隔孢菌、腐皮镰刀菌、尖孢镰刀菌、小麦赤霉菌、玉米弯孢菌共 9 种病原菌(图 6 和图 7)，表现出较强的抗菌广谱性。值得关注的是，这一株嗜盐放线菌为 *Nocardopsis*。11 种病原菌中，抗棉柱隔孢菌的阳性菌株数最多，共 7 株，占代表菌株的 31.8%；而对于白色念珠菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌，在实验中并无任何嗜盐菌对其表现出抑菌活性(表 4)。综上所述，艾丁湖嗜盐放线菌的抑菌活性要强于嗜盐细菌。

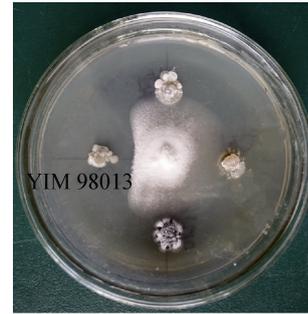


图 6 YIM 98013 对黄瓜枯萎病菌的拮抗效果图

Figure 6 The result of antagonism between strain YIM 98013 and *Cucurbiturium*



图 7 YIM 98013 对尖孢镰刀菌的拮抗效果图

Figure 7 The result of antagonism between strain YIM 98013 and *Fusarium oxysporum*

表 4 代表菌株的抗菌活性(抑菌圈半径, mm)

Table 4 Antimicrobial activity of representative strains (radius of inhibition zone, mm)

菌株编号 Strain No.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
YIM 98039	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-	-
YIM 98046	3.0	-	-	-	-	5.0	3.0	-	1.0	-	7.7	-
YIM 98088	-	-	3.3	-	-	5.0	6.0	2.5	-	-	-	-
YIM 98013	9.3	-	7.0	3.3	-	8.7	8.7	7.6	8.0	5.7	2.3	-
YIM 98016	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0	-
YIM 98026	-	-	-	-	-	7.0	-	-	-	-	-	-
YIM 98007	-	-	-	-	-	-	10.0	-	1.0	-	-	-
YIM 98023	-	-	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-	-
YIM 98030	-	-	-	-	-	-	4.0	-	-	-	-	-
YIM 98032	-	-	-	-	-	2.0	-	-	-	-	-	-

注：A：稻瘟病菌；B：白色念珠菌；C：烟草赤星病菌；D：伤寒沙门氏菌；E：金黄色葡萄球菌；F：黄瓜枯萎病菌；G：棉柱隔孢；H：腐皮镰刀；I：尖孢镰刀菌；J：小麦赤霉菌；K：玉米弯孢菌；L：大肠杆菌；-：无活性。

Note: A: *Pyricularia oryzae*; B: *Gibberella saubinetii*; C: *Alternaria alternata*; D: *Salmonella typhi*; E: *Staphylococcus aureus*; F: *Cucurbiturium*; G: *Ramularia areola* Atk.; H: *Fusarium solani*; I: *Fusarium oxysporum*; J: *Gibberella saubinetii*; K: *Curvularis lunata*; L: *Escherichia coli*; -: Negative.

3 结论与讨论

目前, 对新疆盐湖嗜盐放线菌的研究较多, 但对嗜盐细菌的研究却相对较少。艾丁湖也是如此, 仅 1997–1998 年间迪丽拜尔·托乎提等^[25-26]对新疆艾丁湖及邻近地区的嗜盐菌进行过区系调查和数量分布统计, 但大多研究集中于分离、计数及生理生化特征。直至 2013 年董秀黄^[27]利用 Biolog 技术研究了艾丁湖及哈密南湖两土样多样性, 才对艾丁湖土样中的嗜盐细菌类群分布有了初步的了解。本研究采用 20 种糖及糖的衍生物作为唯一碳源, 对艾丁湖土样嗜盐菌进行分离, 在研究艾丁湖嗜盐菌多样性的同时, 也对该 20 种碳源的分离效果做了评估, 进一步弥补艾丁湖嗜盐细菌研究的空缺。

本研究分离发现, 艾丁湖嗜盐细菌的数量和分布种属都远胜于嗜盐放线菌。Firmicutes 门为优势类群(36 株, 58.1%), *Nocardiopsis* (11 株, 17.7%) 和 *Pontibacillus* (10 株, 16.1%) 属为优势属。以水苏糖作碳源分离到的 *Pontibacillus* 属菌株较多, 占 *Pontibacillus* 属的 70%, 可能是此环境下的微生物比较喜好利用水苏糖所致。其中, *Streptomyces*、*Amycolatopsis*、*Nocardiopsaceae* 3 个属在以前对艾丁湖放线菌的研究中已被发现^[11], *Kocuria* 属在其他盐湖中有过报道^[28], 但在艾丁湖土样中还是第一次被分离到。所分离到的嗜盐细菌中, *Gracilibacillus*、*Halomonas*、*Bacillus*、*Tenuibacillus*、*Halobacillus*、*Marinobacter* 这 6 个属在七角井盐湖中也存在^[5], 说明盐湖中嗜盐细菌的主要属别是相同的。*Bacillaceae* 和 *Halomonadaceae* 科在董秀黄^[27]对艾丁湖嗜盐菌的研究中被报道过, 但 *Phyllobacteriaceae*、*Alteromonadaceae*、*Ectothiorhodospiraceae* 这 3 个科的嗜盐细菌在以前相关文献中并未见报道, 说明艾丁湖潜在的微生物资源还很多, 有待进一步发掘。

从 5 个土样的分离结果中看出, 采样点的位置及环境对嗜盐菌的分离结果有着极大影响, D4 土样采自艾丁湖的湖底泥, 营养较丰富, 有机物较

多; 而 D3 号土样采自小盐池, 高盐少水的环境可能对微生物的生存制造了困难, 因此数量和类群都较少。分离到较多放线菌的 D5 号土样, 则可能因为采自湖边大节节草附近, 受根际效应影响, 微生物富集于此。

酶活筛选结果显示艾丁湖嗜盐菌的蛋白酶活性和酯酶活性较好, 而淀粉酶活性相对较差, 嗜盐细菌在酯酶活性筛选中的表现好于嗜盐放线菌。这一结果与七角井^[5]和罗布泊^[3]盐湖略有差异, 艾丁湖嗜盐菌的淀粉酶活性远逊于这两个盐湖, 而蛋白酶活性三者均表现较好。在抗菌实验中表现突出的 YIM 98013 在酶活筛选中却并没有检测到任何活性, 这一现象也值得关注。此外, 结合产酶和系统发育分析还发现: 同一个属的嗜盐菌产酶特性也存在较大的差异, 如 YIM 98016、YIM 98032、YIM 98003 均为 *Marinobacter* 属, 但前两者同时具有淀粉酶和酯酶活性, YIM 98003 却只有较微弱的酯酶活性。

研究分离出的嗜盐菌对病原细菌的抑制效果普遍较差, 只有一株对伤寒沙门氏菌有抑菌效果, 这一现象与所分得嗜盐放线菌数较少有关系, 由于放线菌能合成抗生素及其他生物活性物质, 在以前的研究中主要是针对放线菌对病原菌的抑菌效果来进行试验, 而此次在放线菌较少的情况下又加入了细菌进行抑菌试验, 因此总体抑菌效果较差。但同时也发现, 部分细菌对一种及以上的病原真菌有抑菌效果, YIM 98046 更是对 5 种病原真菌有抑菌效果, 其中对玉米弯孢病原菌的抑菌圈半径达到了 7.7 mm, 这一现象也启示今后在研究放线菌抑菌活性的同时, 也应放一部分注意力在细菌的抑菌活性上。同时, 该实验也弥补了艾丁湖嗜盐菌在抑菌活性研究上的空白。

综上所述, 艾丁湖嗜盐菌的多样性较为丰富, 在酶学应用及开发新型生物活性方面具有很大的潜力, 其代谢产物也具有极大的研究价值, 有待在此基础上进行深入研究, 对艾丁湖嗜盐菌资源进行开发利用。

参 考 文 献

- [1] Guan TW. Diversity analysis and polyphasic taxonomy of actinobacteria of sediment samples from Lop Nur Salt Lake in Xinjiang, China[D]. Chengdu: Doctoral Dissertation of Sichuan Agricultural University, 2012 (in Chinese)
关统伟. 新疆罗布泊盐湖放线菌多样性及多相分类[D]. 成都: 四川农业大学博士学位论文, 2012
- [2] Han J. Study on biodiversity and enzyme-producing characteristic of halophilic bacteria from Lop Nur Region in Xinjiang[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2008 (in Chinese)
韩剑. 新疆罗布泊嗜盐细菌的多样性及产酶特性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2008
- [3] Liu BB. Diversity and functional enzyme screening of cultured halophilic archaea in Lop Nur Region[D]. Alar: Master's Thesis of Tarim University, 2011 (in Chinese)
刘冰冰. 新疆罗布泊地区可培养嗜盐古菌多样性及其功能酶筛选[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2011
- [4] Shi R. Diversity of culturable actinobacteria and PKS I gene from Qijiaoqing salt lake in Xinjiang[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2011 (in Chinese)
石蓉. 新疆七角井盐湖可培养放线菌及其I型PKS基因多样性研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2011
- [5] Chen C. Diversity of culturable bacteria from Qijiaoqing Lake in Xinjiang and their ability to produce enzymes[D]. Alar: Master's Thesis of Tarim University, 2011 (in Chinese)
陈超. 新疆七角井盐湖可培养细菌多样性及其功能酶筛选[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2011
- [6] Zhang ZY. Study on secondary metabolites of a halophilic bacterium[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan Normal University, 2015 (in Chinese)
张正芸. 一株嗜盐菌次生代谢产物研究[D]. 昆明: 云南师范大学硕士学位论文, 2015
- [7] Cao LL. Study on diversity and polyphasic taxonomy of actinomycetes isolated from Hami Salt Lakes in Xinjiang[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2009 (in Chinese)
曹兰兰. 新疆哈密地区盐湖放线菌多样性及多相分类研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2009
- [8] Izzat O. SD modeling of Turpan oasis socio-ecological system drawing on Luhmann's social theory[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang University, 2014 (in Chinese)
依再提·乌斯满. 基于卢曼社会理论的吐鲁番绿洲社会-生态系统动态仿真研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文, 2014
- [9] Tang SK. Diversity of culturable actinomycetes in hypersaline environment of Xinjiang[D]. Kunming: Doctoral Dissertation of Yunnan University, 2007 (in Chinese)
唐蜀昆. 新疆高盐环境可培养放线菌多样性研究[D]. 昆明: 云南大学博士学位论文, 2007
- [10] Zhang YJ. A new study for isolation of actinomycetes in salt environment based on Biolog technology[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2012 (in Chinese)
张芸娇. 基于 Biolog 技术对盐环境放线菌分离方法的新探究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2012
- [11] Jia M. Mining of actinomycetales resources in hypersaline environment from Aidinglake[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2014 (in Chinese)
贾夔. 艾丁湖地区高盐环境放线菌物种资源的挖掘[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2014
- [12] Liu J. Isolation, diversity and antibiotic activity of actinomycetes from *Apis cerana cerana* Fabricius[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2015 (in Chinese)
刘娟. 中华蜂内共生放线菌的分离、多样性及抗菌活性研究[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2015
- [13] Liao P, Zhao C, Zhang HN, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria isolated from *Melia toosendan* Sieb. et Zucc[J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2374-2385 (in Chinese)
廖萍, 赵翀, 张瀚能, 等. 川楝内生放线菌多样性及抗菌活性筛选[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2374-2385
- [14] Zhang YQ, Li WJ, Chen GZ, et al. Comparison of five PCR template preparation methods for fast identification of actinobacteria[J]. Biotechnology, 2004, 14(5): 37-39 (in Chinese)
张玉琴, 李文均, 陈国忠, 等. PCR 法快速识别 Actinobacteria 的五种模板制备方法的比较[J]. 生物技术, 2004, 14(5): 37-39
- [15] Zhou SQ, Huang XL, Huang DY, et al. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(2): 123-125 (in Chinese)
周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. 生物技术通报, 2010(2): 123-125
- [16] Hall TA. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1999, 41(41): 95-98
- [17] Lu KY, Zhang YF, Jia M, et al. Bacteria distribution diversity in tea rhizospheric soil from different habitats at nannuo mountain based on 16S rRNA sequence analysis[J]. Journal of Kunming University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2016, 41(2): 89-95 (in Chinese)
卢开阳, 张云峰, 贾夔, 等. 基于 16S rRNA 序列分析南糯山不同生境茶树根际土壤细菌群落分布多样性[J]. 昆明理工大学学报: 自然科学版, 2016, 41(2): 89-95
- [18] Bascom-Slack CA, Ma C, Moore E, et al. Multiple, novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(2): 374-383
- [19] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599
- [20] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and

- Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [21] Zhang WQ, Zhang YG, Fang BZ, et al. Studies on diversity of culturable bacteria in karst cave soil of Xingyi, Guizhou and their protease and amylase activities[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 955-964 (in Chinese)
张万芹, 张永光, 房保柱, 等. 贵州兴义喀斯特洞穴土可培养细菌多样性及其产蛋白酶、淀粉酶活性筛选[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 955-964
- [22] Yang YL, Zhao C, Liao P, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from *Glycyrrhiza flata* Bat[J]. Microbiology China, 2016, 43(10): 2138-2147 (in Chinese)
杨雅琳, 赵翀, 廖萍, 等. 塔里木盆地胀果甘草内生放线菌多样性及抗菌活性分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2138-2147
- [23] Zhao LF, Xu YJ, Peng DH, et al. Screening and inhibitory effect of antagonistic endophytic bacteria associated with soybean root nodules against *Magnaporthe Grisea*[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 998-1008 (in Chinese)
赵龙飞, 徐亚军, 彭顶华, 等. 稻瘟病菌拮抗性大豆根瘤内生细菌的筛选及抑制效果[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 998-1008
- [24] Tan L, Yuan B, Qin S, et al. Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinobacteria from *Ginkgo biloba*[J]. Microbiology China, 2015, 42(6): 1043-1051 (in Chinese)
谭力, 袁博, 秦盛, 等. 邳州银杏内生放线菌分离、筛选及活性菌株鉴定[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 1043-1051
- [25] Dilbar T, Xu XJ. The numerical distribution of halophilic bacteria and halotolerant bacteria in Aydin Lake and the surrounding area[J]. Acta Ecologica Sinica, 2001, 21(8): 1388-1391 (in Chinese)
迪丽拜尔·托乎提, 徐晓晶. 新疆艾丁湖及邻近地区嗜盐菌和耐盐菌的数量分布[J]. 生态学报, 2001, 21(8): 1388-1391
- [26] Dilbar T, Xu XJ, Jiamila M. A study of halobacteria in the extreme environment around the Ayding Lake[J]. Arid Zone Research, 1999, 16(1): 25-28 (in Chinese)
迪丽拜尔·托乎提, 徐晓晶, 加米拉·买买提. 艾丁湖极端环境中嗜盐菌的研究[J]. 干旱区研究, 1999, 16(1): 25-28
- [27] Dong XH. Diversity of halophilic bacteria in Xinjiang two salt lakes using an integrated approach of BIOLOG carbon source screening and culture-dependent methods[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang University, 2013 (in Chinese)
董秀黄. 结合 BIOLOG 碳源筛选研究新疆两盐湖可培养嗜盐菌多样性[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学硕士学位论文, 2013
- [28] Xia ZF. Studies on the actinobacterial diversity in aiding lake sediment[D]. Alar: Master's Thesis of Tarim University, 2011 (in Chinese)
夏占峰. 艾丁湖沉积物放线菌多样性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2011