

新疆高盐环境土壤放线菌分离培养基比较*

关统伟^{1,2,3} 赵珂² 夏占峰¹ 吕玲玲¹ 张小平² 张利莉^{1**}

(¹塔里木大学塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室 阿拉尔 843300)

(²四川农业大学资源环境学院 雅安 625000)

(³微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101)

摘要 根据采样点及其样品相关信息结合近几年对高盐环境放线菌的分离经验,设计出一种含有10%~30%复合盐的CMKA培养基,同时以补充10%~30%复合盐的高氏一号琼脂培养基(GA)、ISP 4培养基、淀粉酪素琼脂培养基(SCK)和HV培养基为对照,对采集于新疆阿克陶盐山、罗布泊洼地和阿克苏盐碱地的3份土壤样品利用上述5种培养基进行了分离。结果表明,CMKA培养基分离效果最好,共分离到7个属的放线菌(*Actinopolyspora*、*Streptomonospora*、*Nocardiopsis*、*Saccharomonospora*、*Brevibacterium*、*Streptomyces*和*Amycolatopsis*),并且获得1个放线菌新种(TRM F103)。ISP 4、GA、HV和SCK培养基分离效果较差,获得的属级分类单元少。同时,CMKA培养基的出菌率也是最高的,说明比较适合分离高盐环境土壤放线菌,而用于分离普通环境中放线菌的ISP 4、GA、HV和SCK培养基则不适于高盐环境放线菌的分离。此外,新疆的高盐环境土壤存在着丰富的放线菌资源,包括一些新类群的存在。图1 表2 参13

关键词 高盐环境;放线菌;分离培养基

CLC Q93-335 : Q939.130.8 (245)

Comparison of Isolation Media for Actinobacteria from Different Saline Environments in Xinjiang, China*

GUAN Tongwei^{1,2,3}, ZHAO Ke², XIA Zhanfeng¹, LÜ Lingling¹, ZHANG Xiaoping² & ZHANG Lili^{1**}

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

(²Faculty of Resource and Environmental Sciences, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625000, Sichuan, China)

(³State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Five media, namely, CMKA, GA, ISP 4, HV and SCK mixed with NaCl, KCl and MgCl₂ at concentrations ranging between 10%~30% (w/V), were compared and used to isolate actinobacteria from saline soils in Akesu, Luobopo and Aketao in Xinjiang, China. The results indicated that the CMKA was the best among the five media for isolating actinobacteria. *Actinopolyspora*, *Streptomonospora*, *Nocardiopsis*, *Saccharomonospora*, *Brevibacterium*, *Streptomyces* and *Amycolatopsis* were isolated by CMKA, including one novel species, named as TRM F103 and belonging to *Amycolatopsis*. The other four media were found not so good and only four genera were isolated with, namely, *Streptomonospora*, *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis* and *Streptomyces*. So, HV, GA, ISP 4 and SCK were not suitable to isolate actinobacteria from saline environment, but they could be used to isolate actinobacteria from common environment soil. This study also indicated that in the saline soils in this region there were not only abundant actinomycetes, but also some unknown actionobacterial groups existed there. Fig 1, Tab 2, Ref 13

Keywords saline environment; actinobacteria; isolation medium

CLC Q93-335 : Q939.130.8 (245)

近年来,人们在许多被认为是生命禁区的环境发现了多

式多样的具有极强生命力的特殊环境微生物。这类微生物具有独特的基因类型、生理机制和代谢产物,潜藏着极大的应用价值。新疆具有112个面积大于1 km²的天然盐湖^[1]以及类型独特的盐碱地、盐山、盐池以及盐矿等,这些高盐环境是寻找具有特殊生命力微生物种群的场所,是研究生命奥秘的源头。但由于分离技术的限制,极端环境微生物的物种发现较少,对其生理学、遗传学、适应机制等研究更是远远不够。通过分子生态学的手段已发现新疆的高盐环境中存在大量的未知放线菌资源^[2~3],如何获得这些活的不可培养微生物就成为必须解决的现实问题。为此,本应用微生物研究室根据近几年对高盐环境放线菌资源研究的经验及土壤盐分离子的多样性,设计了一种分离新疆高盐环境放线菌的CMKA

收稿日期: 2009-07-08 接受日期: 2009-08-13

*教育部科学技术研究重点项目(No.209145)、国家自然科学基金项目(No. 30660005)、微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题(No. SKLMR-20090603)、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)和新疆高等学校科研计划创新研究群体基金项目(No. XJEDU2005G07)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30660005), the Key Science and Technology Project of Ministry of Education of China (No. 209145), the Opening Project of State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (No. SKLMR-20090603), the Opening Project of Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in the Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps, China (No. BR0803) and the Program of the Higher Education Institution of Xinjiang, China (No. XJEDU2005G07)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn)

培养基,同常用的高氏一号培养基、HV琼脂培养基、ISP 4^[4]和淀粉酪素琼脂培养基相比,分离效果显著,并得到1个放线菌新种.研究通过探索盐环境微生物的分离条件,以期为一类极具开发潜力的微生物积累种质资源.

1 材料与方法

1.1 土壤样品采集和成分测定

2008年10月从新疆阿克陶盐山、罗布泊洼地以及阿克苏的盐碱地采集约30 cm深的浅层土壤,3个地区生态类型差异大,是比较研究不同高盐环境土壤类型的典型样品.分别在3个样点采集6份样品,样品采集后装于灭菌的50 mL带螺口离心管中,置于便携式冰箱4℃保存,运抵实验室后立即超低温保藏,使用时把每个样点的6份土壤混合均匀,取适量进行相关实验.同时,为了更好地设计符合高盐环境微生物生长的实验条件,测定了3份相应混合土样的成分.土壤样品特征见表1.

表1 土壤样品特征

Table 1 Geochemical parameters of the studied soil samples from saline environment in Xinjiang

项目 Item	阿克苏 In Akesu	罗布泊 In Luobupo	阿克陶 In Aketao
pH	7~7.5	7.3	7.0
Na ⁺ (w/g kg ⁻¹)	53.22	123.17	71.51
K ⁺ (w/g kg ⁻¹)	0.28	6.15	2.79
Mg ²⁺ (w/g kg ⁻¹)	0.38	1.12	0.81
Ca ²⁺ (w/g kg ⁻¹)	0.22	0.48	0.33
Organic matter (w/g kg ⁻¹)	7.59	6.29	18.78

1.2 菌株分离培养基

实验中采用我们设计的CMKA培养基[Casein acids Hydrolysate 0.5 g, Mannitol 1.5 g, KNO₃ 1 g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, K₂HPO₄ 0.5 g, CaCO₃ 0.5 g, Water 1 000 mL,并补充不同比例的复合盐(15% NaCl, 5% KCl和1% MgCl₂), Agar 20 g].同时,以补充含相同比例复合盐的高氏一号琼脂培养基(GA,其成分为soluble starch 20 g, KNO₃ 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, Water 1 000 mL, Agar 20 g)、HV琼脂培养基^[5]、ISP 4琼脂培养基和淀粉酪素琼脂培养基(SCK,其成分为soluble starch 10 g, Casein 0.3 g, KNO₃ 2 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 2 g, CaCO₃ 0.02 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, Water 1 000 mL, Agar 20 g)为对照.所有培养基的pH值均调为7.0~7.5.

1.3 主要实验仪器及试剂

蛋白酶K(Proteinase K, Merck)、Taq 酶(TaKaRa)、dNTPs(TaKaRa)、DNA Marker(Sangon)、其他生化试剂均为国产分析纯.主要仪器有凝胶成像仪(Bio-rad)、电泳仪(Bio-rad)、PCR扩增仪(Bio-rad)等.

1.4 16S rRNA基因测定与系统发育分析

菌株DNA的提取、16S rRNA基因的PCR扩增均采用Cui等使用的方法^[6]进行.扩增与测序采用引物:正向引物PA(5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3')和反向引物PB(5'-AGGAGGTGATCCAGCCGC A-3'),扩增产物送到上海生物工程有限公司进行测序.采用MEGA 4.0(Molecular evolutionary genetics analysis)软件及邻接法(Neighbor-Joining)聚类分析,构建系统进化树^[7].同时,重复取样1 000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^[8].

2 结果与分析

把分离得到的菌株纯化后进行PCR扩增和测序,然后用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,以16S rRNA基因序列相似性低于97%作为新的分类单元,相似性大于97%归于已知物种来计算^[9],并把相应分离菌株与所归类的属级分类单元按照不同培养基分离的结果及出菌率情况对应列于表2.

表2 不同培养基分离放线菌结果比较

Table 2 Comparison of actinobacteria isolated by different media

培养基 Medium	分离属的数量 Genera isolated	出菌率 Isolated actinobacteria (r/%)
CMKA	<i>Streptomyces</i> , <i>Saccharomonospora</i> , <i>Streptomonospora</i> , <i>Nocardiopsis</i> , <i>Actinopolyspora</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Amycolatopsis</i>	62.5
ISP 4	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardiopsis</i> , <i>Actinopolyspora</i> , <i>Streptomonospora</i>	50
SCK	<i>Streptomyces</i> , <i>Streptomonospora</i> , <i>Nocardiopsis</i>	62.5
GA	<i>Streptomyces</i> , <i>Nocardiopsis</i>	33.3
HV	<i>Streptomyces</i>	16.7

分析结果,CMKA培养基分离效果最好,一共获得7个属(*Actinopolyspora*、*Streptomonospora*、*Nocardiopsis*、*Saccharomonospora*、*Brevibacterium*、*Streptomyces*和*Amycolatopsis*)的放线菌;其次是ISP 4培养基,共分离到4个属的放线菌;淀粉酪素培养基(SCK)分离到*Streptomonospora*、*Streptomyces*和*Nocardiopsis*属;GA培养基分离到2个属(*Streptomyces*和*Nocardiopsis*);HV培养基分离得到的属最少,仅分离到*Streptomyces*.CMKA培养基和SCK培养基的出菌率最高,均达到了62.5%;SCK培养基和GA培养基的出菌率分别为50%和33.3%;而HV培养基的出菌率最低,仅为16.7%.因此,使用常规分离普通环境放线菌的培养基来分离高盐环境下的放线菌效果较差,GA培养基在分离盐环境土壤放线菌的结果就不是很理想.用于分离普通环境稀有放线菌的HV培养基也不适合分离高盐环境放线菌,仅仅分离到链霉菌.这可能是由于高盐环境放线菌的生理和营养需求特殊造成的.CMKA培养基分离效果较好,不仅分离到的放线菌属级分类单元最多,出菌率最高,而且分离到1株放线菌新种(TRM F103).在NCBI中同相近种进行BLAST搜索,结果同最近种的相似性仅为95.3%,该菌的多相分类正在进行中,其相应的系统发育地位见表1.因此,CMKA培养基可以作为有效分离盐环境土壤放线菌的培养基.这些结果也说明,塔里木盆地的各种高盐环境具有较为丰富的放线菌物种多样性,并且潜藏着一些新类型的放线菌资源.

3 讨论

放线菌作为生物活性物质的产生菌,早已成为研究焦点.但随着常见菌种的大量重复筛选,发现新化合物的几率也越来越低,以至于人们把目光转向极端环境,以期发现新的稀有放线菌物种和新的化合物.由于极端环境中的放线菌对生长环境的特殊需求,使用常规的分离培养基很难分离到.我们在研究嗜盐放线菌时发现,如果采用分离普通环境放线菌很好的培养基,即使添加一定浓度的NaCl,也很难达

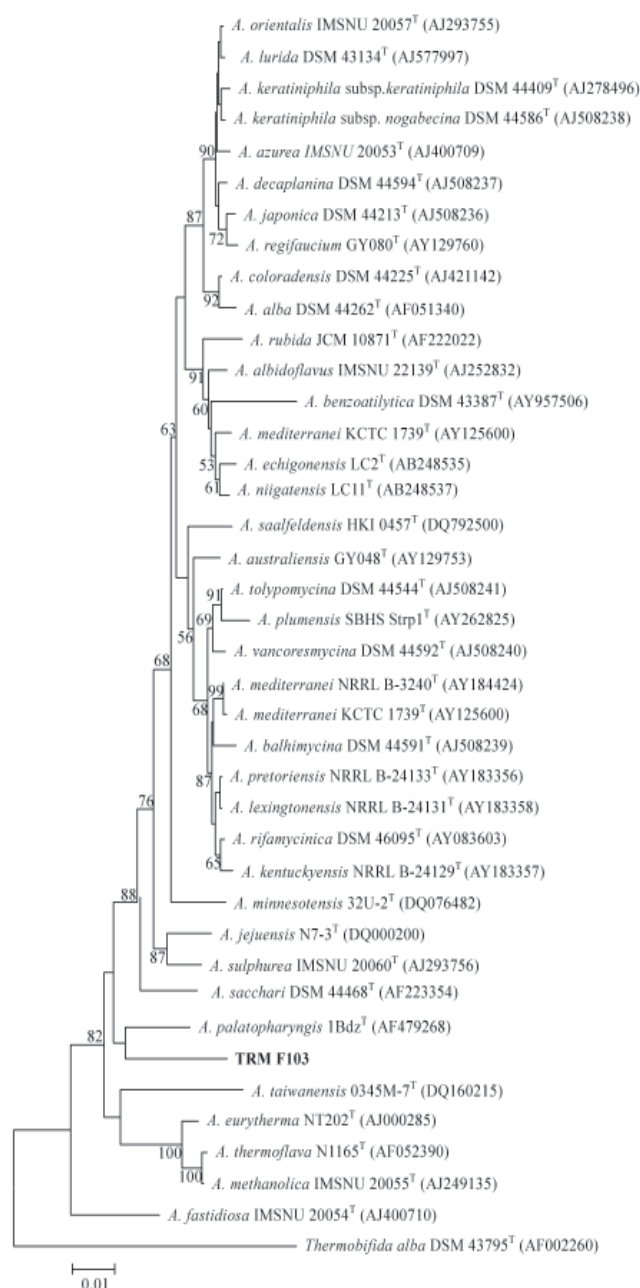


图1 用邻接法构建的TRM F103菌株和相应放线菌的16S rDNA系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain TRM F103 and its near neighbours calculated based on 16S rRNA gene sequences using Kimura's evolutionary distance method^[10] and the neighbour-joining method^[11] Bar, 0.01 nucleotide substitutions per site

到预期的分离结果。我们的实验也证明,大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,说明盐环境微生物同普通环境微生物的营养代谢类型、营养生理需求有较大的差异。

用于选择性分离嗜盐放线菌的培养基必须满足嗜盐放线菌的特殊需求。从表1中也可以发现,高盐环境中离子类型比较复杂,阳离子不仅含有 Na^+ ,还有 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等,并具有不可忽视的含量组成。因此,如果仅使用 NaCl 作为单一的

盐加入到分离培养基中同复合盐进行分离相比,则会显著降低出菌率(数据未列出),这也说明微生物对不同的盐离子具有一定的依赖性,我们近几年的实验也证明这点。因此,我们针对不同放线菌对不同盐离子类型的选择和适应的多样性等生理学特点,结合对盐环境土壤成分的测定结果及分离经验,设计了CMKA培养基。实验结果表明CMKA培养基能够分离到较多的稀有放线菌资源,甚至一些新的物种。唐蜀昆等也对高盐环境中放线菌的分离做了较好的研究和总结,获得了一些好的分离培养基和分离经验^[12],值得参考和借鉴,如其设计的改良淀粉酪素培养基可以高选择性地分离*Saccharomonospora*、*Actinopolyspora*、*S. treptomonospora*、*Saccharopolyspora*等类群,出菌率达90%以上。我们采用上述几种培养基对3个样点样品的分离结果来看,罗布泊中获得的放线菌属级分类单元最多(数据未列出),也是3个样点中盐度最高的,这有可能同它的高盐环境和分离的盐浓度有关。

根据我们对高盐环境的免培养研究,发现高盐环境中80%以上的放线菌未获得纯培养^[13]。因此,不断设计新的分离技术,挖掘未知微生物资源将是微生物工作者今后的一项重要任务。

References

- 1 郑喜玉, 张明刚, 徐昶. 中国盐湖志. 北京: 科学出版社, 2002
- 2 Guan TW (关统伟), Zhao K (赵珂), Xia ZF (夏占峰), Shun HZ (孙红专), Zhang LL (张利莉). Structure of a soil sample from Yutian Pit in Xinjiang revealed by culture-independent method. *Microbiol Bull* (微生物学通报), 2009, **36** (4): 515~521
- 3 Guan TW (关统伟), Wu JY (吴晋元), Zhi XY (职晓阳), Tang SK (唐蜀昆), Li WJ (李文均), Zhang LL (张利莉). Actinobacterial diversity of a sediment sample from Xiaokule Lake. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2008, **48** (7): 851~856
- 4 Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 1966, **16**: 313~340
- 5 Hayakawa M. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actionmycetologica*, 2008, **22**: 12~19
- 6 Cui XL, Mao PH, Tseng M, Li WJ, Zhang LP, Xu LH, Jiang CL. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of family Nocardiopsaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, **51**: 357~363
- 7 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406~425
- 8 Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, **39**: 783~791
- 9 Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, **44**: 846~849
- 10 Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *J Mol Evol*, 1980, **16**, 111~120
- 11 Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406~425
- 12 Tang SK (唐蜀昆), Jiang Y (姜怡), Zhi XY (职晓阳), Li WJ (李文均), Xu LH (徐丽华). Isolation methods of halophilic actinomycetes. *Microbiol Bull* (微生物学通报), 2007, **34** (2): 6199~6200
- 13 Wu JY, Guan TW, Jiang HC, Zhi XY, Tang SK, Dong HL, Zhang LL, Li WJ. Diversity of actinobacterial community in saline sediments from Yunnan and Xinjiang, China. *Extremophiles*, 2009, **13**: 623~632