

## 新疆青海中度嗜盐放线菌生物多样性初步研究

李文均 唐蜀昆 王 栋 徐丽华 姜成林

(云南大学云南省微生物研究所 教育部微生物资源开放研究重点实验室 昆明 650091)

**摘 要** :从我国新疆、青海等地采集数份盐碱土样或泥样,采用淀粉-酪素琼脂培养基、甘油天门冬酰胺琼脂培养基、土壤浸汁琼脂培养基分别从中分离到 8 株、32 株中度嗜盐放线菌菌株。经形态、生理学特性与全细胞壁氨基酸组分分析结果比较,选取其中的 14 株进行 16S rDNA 序列分析。就物种多样性而言,新疆、青海分离到中度嗜盐放线菌分布至少有 3 个科 5 个属。其中有拟诺卡氏菌科(Nocardiopsaceae)的拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)和链单孢菌属(*Streptomonospora*);假诺卡氏菌科(Pseudonocardiaceae)的普氏菌属(*Prauserella*)和糖单孢菌属(*Saccharomonospora*);链霉菌科(Streptomycetaceae)的链霉菌属(*Streptomyces*)。就地区分布来讲,新疆分离到的中度嗜盐放线菌种类要远高于青海。

**关键词** 嗜盐放线菌, 16S rDNA, 生物多样性

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)01-0001-07

放线菌被认为是一类界限微生物。嗜盐放线菌是研究生物进化和系统发育的极好材料,而这方面在国内外尚少报道。嗜盐放线菌研究又是极端环境微生物研究的重要组成部分。我国西部地区有大面积的盐湖和盐碱地,新疆盐碱土的面积达 7330 万公顷,还有青海等西部不少的极端高盐环境。这些地方不但蕴藏着极其丰富的盐类和各种稀有的矿产资源,而且有极为宝贵的嗜盐微生物资源。这些自然资源为我们开展极端环境放线菌研究提供了得天独厚的条件。同嗜盐细菌相比,国内外对嗜盐放线菌的研究要少得多,且都为零星的新分类单元的报道,很少有针对某一地区的嗜盐放线菌资源进行深入分析研究的。本实验是根据近年来我们对从新疆、青海采集的数份盐碱土样或泥样,设计不同培养基进行嗜盐放线菌的分离,并对其多样性进行分析。

### 1 材料和方法

#### 1.1 样品的采集和菌株分离

从新疆的拜城盐场、和硕盐场、艾丁湖、小盐湖,青海的茶卡盐湖、柯柯盐湖等地共采集 200 余份盐碱地土样或泥样。样品经稀释涂布平板,在 28℃ 的

温室中培养 2~3 周,根据菌落大小、形态、颜色进行初步分离筛选并纯化。

#### 1.2 培养基

淀粉-酪素琼脂培养基:每升含可溶性淀粉 10g, Casein 0.3g, KNO<sub>3</sub> 2g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 2g, CaCO<sub>3</sub> 0.02g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10mg, NaCl 200g, 琼脂 20g, pH 为 7.2~7.4。

甘油-天门冬酰胺琼脂培养基(ISP5):每升含 L-天门冬酰胺 1g, 甘油 10g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 1g, 微量盐 1mL, 琼脂 20g, pH 为 7.0~7.4。

微量盐溶液配制:FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.1g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, ddH<sub>2</sub>O 100mL。

土壤浸汁培养基:每升含土壤浸汁 1000mL, 牛肉膏 3g, 蛋白胨 5g, 琼脂 20g, pH 为 7.0。

土壤浸汁的制备:取土壤 1kg 加 2.5 L 自来水, 1×10<sup>5</sup> Pa, 1h 高压加热, 乘热过滤。

#### 1.3 NaCl 和 pH 耐受实验

NaCl 和 pH 耐受实验方法参见文献 [1]。

#### 1.4 形态观察

分别用察氏琼脂培养基、酵母膏-麦芽膏琼脂培

基金项目 国家自然科学基金项目(30270004);云南省自然科学基金项目(2001C0001Q);云南省教育厅基金项目(01111134, 02QJ077);教育部微生物资源开放研究重点实验室开放基金资助

作者简介 李文均(1973-),男,河南信阳人,博士,副研,主要从事放线菌分离及系统分类学研究。Tel :86-871-5033790; Fax :86-871-5173878; E-mail :liact@hotmail.com

收稿日期 2003-05-06, 修回日期 2003-10-08

培养基和甘油天门冬酰胺琼脂培养基(均含 10% NaCl)于 28℃条件下进行埋片培养,培养 7d、14d、21d 和 28d,分别取出埋片,用光学显微镜 Olympus BH-2 观察形态。通过光学显微镜难以直接确定其形态的部分菌株选择生长密度适宜的培养物直接喷金进行电镜观察。

### 1.5 全细胞壁氨基酸分析

采用 Hasgawa(1983)<sup>[2]</sup>的薄层层析法(Thin layer chromatography, TLC)进行全细胞壁氨基酸分析。

### 1.6 生理学特性研究

生理生化特征的选择主要根据文献[3]中相应属、种鉴定有关的内容进行。主要进行了唯一碳、氮源生长试验、酶的产生、明胶液化、牛奶酪化和凝固、纤维素生长、硝酸盐还原等试验。

### 1.7 16S rDNA PCR 扩增和系统进化分析

1.7.1 菌体总 DNA 的提取:参照 Orsini 等<sup>[4]</sup>和徐平等<sup>[5]</sup>的方法进行。

1.7.2 16S rDNA 扩增引物:正向引物 Primer A(对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 5' 端 8 ~ 27f 位置):5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 Primer B(对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 5' 端 1523 ~ 1504r 位置):5'-TTAAGGATGGTGATGCCGCA-3'。

PCR 扩增条件:95℃先预变性 5min,加 *Taq* 酶后 95℃变性 1min,55℃退火 1min,72℃延伸 3min,共 30 个循环,再 72℃后延伸 5min。

1.7.3 16S rDNA 扩增产物测序:16S rDNA 扩增产物的纯化及测序部分由大连宝生物公司协助完成。

测序所用引物主要有以下两组:第 I 组:KMS098PBr:5'-TAAGGAGGTGATCCAGCC-3';KMS098PDr:5'-GGG-TTGGCCTCGTTG-3';KMS098PCr:5'-TCTGCCGATTTCC-ACCGCTAC-3'。第 II 组:KMS961P1:5'-CGGAATTA-TTGGGCGTA-3';KMS961P2:5'-CCCTACCTGGGCTTG-ACAT-3';KMS957P1:5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3'。

1.7.4 系统进化树的构建和分析:将所得到序列利用 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 rDNA 序列作为参比对象,然后用 CLUSTAL X 软件<sup>[6]</sup>进行多序列比对并计算供试菌株与参比菌株之间的序列相似性,采用邻接法(Neighbor-Joining)<sup>[7]</sup>,用 Treeview<sup>[8]</sup>构建供试菌与参比菌之间的系统进化树。

## 2 结果和讨论

### 2.1 菌种分离结果

经纯化并淘汰重复菌株后,从新疆盐碱土中共分离到 8 株中度嗜盐放线菌,从青海盐碱土样和泥样中共分离到 32 株中度嗜盐放线菌(表 1)。从培养基分离效果来看,淀粉-酪素琼脂培养基和甘油-天门冬酰胺琼脂培养基分离效果较好,其分离到的菌株大都为真正的嗜盐放线菌,而且所分离的菌株种类较多。相对而言,土壤浸汁琼脂培养基分离的效果较差,用其分离到的放线菌大都为耐盐的拟诺卡氏菌属菌株。

表 1 从新疆青海分离到的中度嗜盐放线菌的部分表型特征

Table 1 Partial phenotypic characteristics of the moderately halophilic actinomycetes isolated from Xinjiang and Qinghai Provinces

Strains no.	Isolation place	Amino-acids	Genera	NaCl tolerant range/%	Optimum NaCl/%	pH tolerant range
YIM 90001	Xinjiang	meso-DAP	<i>Prauserella</i>	3 ~ 20	10 ~ 15	6.0 ~ 10.0
YIM 90002	Xinjiang	meso-DAP	<i>Streptomonospora</i>	5 ~ 20	10 ~ 15	6.0 ~ 10.0
YIM 90003	Xinjiang	meso-DAP	<i>Streptomonospora</i>	1 ~ 20	10	6.0 ~ 10.0
YIM 90004	Xinjiang	meso-DAP	<i>Nocardiopsis</i>	3 ~ 20	10	6.0 ~ 10.0
YIM 90005	Xinjiang	meso-DAP	<i>Prauserella</i>	0 ~ 20	10-15	6.0 ~ 10.0
YIM 90006	Xinjiang	meso-DAP	<i>Nocardiopsis</i>	3 ~ 20	10	6.0 ~ 10.0
YIM 90007	Xinjiang	meso-, L-DAP	<i>Saccharomonospora</i>	5 ~ 20	10	6.0 ~ 10.0
YIM 90010	Xinjiang	meso-DAP	<i>Nocardiopsis</i>	3 ~ 20	10	6.0 ~ 10.0
YIM 90012	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90013	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardiopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90014	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardiopsis</i>	1 ~ 20	10	6.0 ~ 10.0
YIM 90015	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardiopsis</i>	3 ~ 20	10	6.0 ~ 10.0
YIM 90016	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardiopsis</i>	3 ~ 20	10	6.0 ~ 10.0
YIM 90017	Qinghai	LL-DAP	<i>Streptomyces</i>	0 ~ 15	10	6.0 ~ 10.0
YIM 90018	Qinghai	LL-DAP	<i>Streptomyces</i>	0 ~ 15	10	6.0 ~ 10.0

续表 1

Strains no.	Isolation place	Amino-acids	Genera	NaCl tolerant range/ %	Optimum NaCl/ %	pH tolerant range
YIM 90021	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90022	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90023	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90024	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90025	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90026	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90027	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90028	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90029	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90030	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90031	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90032	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90033	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90034	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90035	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90036	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90037	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90038	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90039	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90040	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90041	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90042	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90043	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90044	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0
YIM 90045	Qinghai	meso-DAP	<i>Nocardioopsis</i>	0 ~ 20	5 ~ 10	6.0 ~ 10.0

## 2.2 表型特征

根据形态观察结果,新疆分离到的 8 株中度嗜盐放线菌,有两株属于普氏菌属(*Präuserella*) 2 株属于链单孢菌属(*Streptomonospora*),1 株属于糖单孢菌属(*Saccharo monospora*),3 株属于拟诺卡氏菌属(*Nocardioopsis*);而从青海分离到的放线菌除两株菌为链霉菌属(*Streptomyces*)外,其余均为拟诺卡氏菌属(*Nocardioopsis*)。所有分离菌株的耐盐度生长范围参见表 1,从新疆分离的放线菌,除 1 株为耐盐菌之外,其余均为真正的中度嗜盐放线菌,而从青海分离

到的放线菌,除 4 株为中度嗜菌外,其余均为耐盐放线菌。从新疆和青海分离到的中度嗜盐放线菌菌株的生长 pH 范围均为 6.0 ~ 10.0,最适生长 pH 均为 7.0 ~ 9.0(表 1)。

供试的所有中度嗜盐放线菌菌株在牛奶酪化、 $H_2S$  产生以及纤维素生长等方面均为阴性。另外,除供试菌株 YIM 90001 和 YIM 90005 碳源利用范围较广之外,其余大部分中度嗜盐放线菌菌株的碳源利用范围均较窄(表 2)。

表 2 新疆、青海分离的部分中度嗜盐放线菌菌株生理学特性比较

Table 2 Physiological properties of some moderately halophilic actinomycetes isolated from Xinjiang and Qinghai Provinces

Isolates number	1	2	3	4	5	6	7	10	12	13	14	15	16	17
Growth at NaCl/ %														
0	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Optimum growth temperature/ °C	28	28	28	28	28	28	37	28	28	28	28	28	28	28
Gelation liquefaction	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Milk peptonization	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-

续表 2

Isolates number	1	2	3	4	5	6	7	10	12	13	14	15	16	17
Milk coagulation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
H <sub>2</sub> S Production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease production	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Growth in cellulose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melanin production	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Carbon utilization( 1% )														
Glucose	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Meso - inositol	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Mannitol	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Raffinose	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodium citrate	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-
Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Xylose	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sodium acetate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sucrose	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+

1, 2, ..... represent strains YIM90001, YIM90002, ..... respectively; + : Positive; - : Negative.

### 2.3 全细胞壁氨基酸

全细胞壁氨基酸分析的结果表明,除菌株 YIM 90007 同时含 L-DAP 和 meso-DAP,菌株 YIM 90017, YIM 90018 含 L-DAP 之外,其余所有中度嗜盐放线菌均含 meso-DAP(表 1)。

### 2.4 系统发育分析

根据前面形态特征、生理生化特性及全细胞壁氨基酸结果,我们选取其中 14 株中度嗜盐放线菌菌株测定其 16S rDNA 序列并进行了系统进化分析。根据分离菌株的 16S rDNA 序列在 GenBank 等数据库中进行相似性搜索,选定其中同源性较高的相关菌株并与其构建系统发育树(图 1)。

从系统进化树状图可以看出,所有从新疆、青海分离的嗜盐放线菌菌株分别属于 3 个科、5 个属,其中菌株 YIM 90001, YIM 90005, YIM 90007 属于假诺卡氏菌科(Pseudonocardiaceae),其中菌株 YIM 90001, YIM 90005 属于普氏放线菌属(*Prauserella*),从 16S rDNA 序列相似性分析结果来看,两中度嗜盐放线菌菌株分别与本属内的唯一典型种之间的同源性在 97.5% ~ 97.8% 之间。根据我们对其所做的包括形态观察、生理学特性、细胞化学组份、G + C mol%

含量测定及 DNA-DNA 同源性分析等多相分类的结果,两菌株分别属于普氏放线菌属的两个新种,我们将其分别命名为嗜盐普氏放线菌(*Prauserella halophila*)和白色普氏放线菌(*Prauserella alba*)。其分类鉴定结果已另文发表<sup>[9]</sup>。菌株 YIM 90007 属于糖单孢菌属(*Saccharomonospora*),从 16S rDNA 序列分析结果来看,该菌株除与同属内的唯一嗜盐放线菌菌株——嗜盐糖单孢菌(*Saccharomonospora halophila*)的同源性大于 97% 之外,其余均小于 96.4%。根据我们对菌株 YIM 90007 与嗜盐糖单孢菌(DSM 44411<sup>T</sup>)所做的比较分析及 DNA-DNA 杂交实验结果,菌株 YIM 90007 应为糖单孢菌属的一个新种,我们将其命名为弱代谢糖单孢菌(*Saccharomonospora paurometabolica*)。其分类鉴定结果已另文发表<sup>[10]</sup>。

菌株 YIM 90002, YIM 90003, YIM 90004, YIM 90006, YIM 90012, YIM 90013, YIM 90014, YIM 90015, YIM 90016 均属于拟诺卡氏菌科(Nocardiopsaceae)。从 16S rDNA 序列相似性比较分析结果看,嗜盐放线菌菌株 YIM 90002、YIM 90003 与拟诺卡氏菌属的相似性仅为 93.8% ~ 94.8%;与高温双歧放线菌属的相似性也仅为 94.9% ~ 95.1%;另外,从系

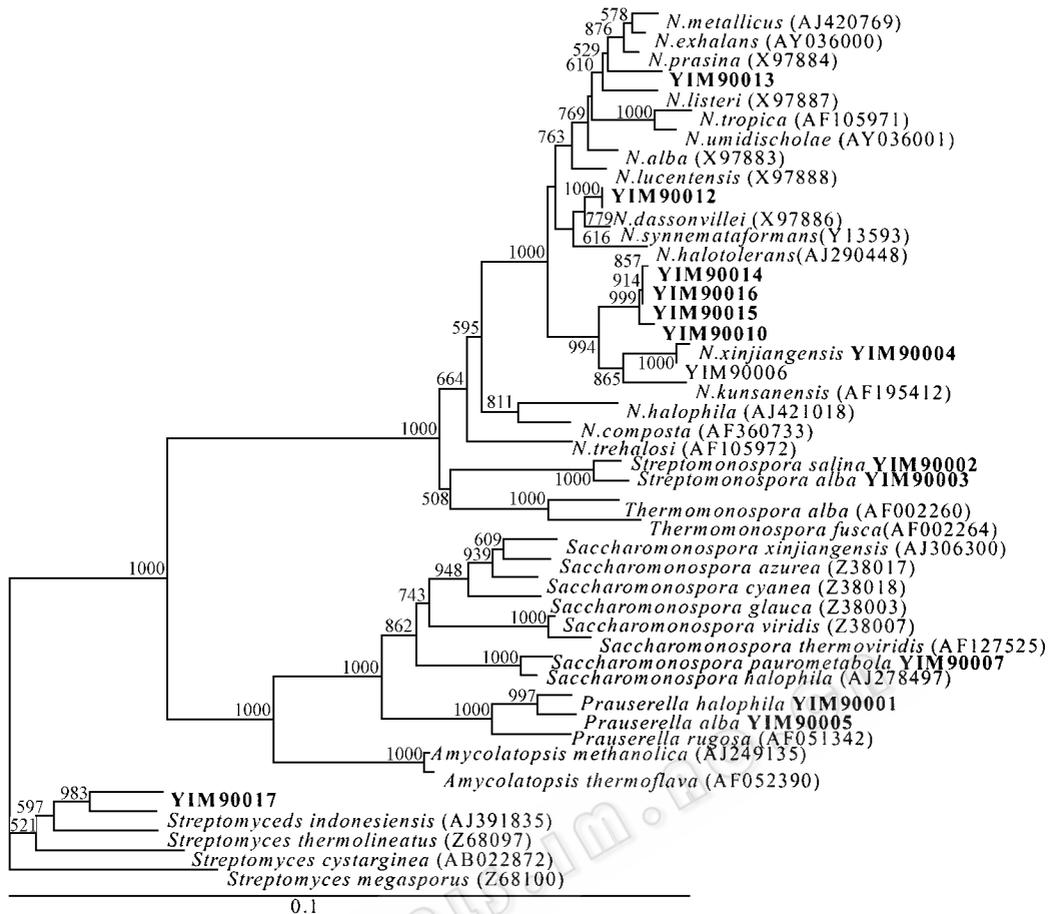


图1 对从新疆青海分离到的部分嗜盐放线菌菌株及其从 GenBank 等数据库中调集的相关属种构建的以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树状关系图

Fig.1 Phylogenetic tree showing the relationships among halophilic actinomycete strains isolated from Xinjiang and Qinghai Provinces and relative species and other taxa downloaded from GenBank based on 16S rDNA sequences. Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 resamplings). The sequence of *Streptomyces megasporus* (Z68100) was used as outgroup. Bar, 0.1 substitutions per nucleotide.

*N.* = *Nocardiothermophilum*.

统进化树的自举值可以看出,菌株 YIM 90002、YIM 90003 在拟诺卡氏菌属与高温双歧放线菌属两属之间能够形成稳定的单独分枝,表明两株供试菌株在分类关系上应与拟诺卡氏菌属及高温双歧放线菌属并列,独立成一个新属,另外菌株 YIM 90002, YIM 90003 无论是从形态上,还是从生理学特性、细胞化学组份上,与后两者均有较大差别。根据我们所做的多相分类研究结果,我们将这两株菌定为嗜盐放线菌的一个新属——链单孢菌属(*Streptomonospora*)<sup>[11]</sup>,且二者分别属于两个不同的新种:盐生链单孢菌(*Streptomonospora salina*, 典型菌株为 YIM 90002<sup>T</sup>)<sup>[11]</sup>和白色链单孢菌(*Streptomonospora alba*, 典型菌株为 YIM 90003<sup>T</sup>)<sup>[12]</sup>。

菌株 YIM 90004, YIM 90006, YIM 90010, YIM 90012, YIM 90013, YIM 90014, YIM 90015, YIM 90016 均属于拟诺卡氏菌科的拟诺卡氏菌属(*No-*

*cardiopsis*)。在所有有效发表的拟诺卡氏菌菌种中,仅有 3 个具有嗜盐特性。其中一个为韩国学者发表的昆山拟诺卡氏菌(*Nocardiothermophilum kunsanensis*)<sup>[13]</sup>,另一个为本室新近发表的新疆拟诺卡氏菌(*Nocardiothermophilum xinjiangensis*, 其典型菌株为 YIM 90004<sup>T</sup>)<sup>[14]</sup>。根据我们多相分类研究的结果,菌株 YIM90006 和菌株 YIM90004 为同一个种(二者的相似性达 99.3%,而且两菌株的 DNA-DNA 同源性大于 70%)。另外从系统进化分析的结果来看,菌株 YIM 90010, YIM 90014, YIM 90015, YIM 90016 四株菌之间的相似性均较高(均大于 99%),而且它们之间的生理学特性差别也较小,我们初步将这 4 株菌并为一个种,并建议其为拟诺卡氏菌属的一个新种——嗜盐拟诺卡氏菌(*Nocardiothermophilum salina*, 其典型菌株为 YIM 90010<sup>T</sup>)。当然,这还要通过对菌株 YIM 90010、YIM 90004(*N. xinjiangensis*)、*N. kunsanensis* 进行包括形态观察、生

理学特性、细胞化学组分、G + C mol% 含量测定及 DNA-DNA 同源性分析等在内的多相分类研究才能最终确定其分类地位。

菌株 YIM 90013 与拟诺卡氏菌属的 *N. metallica*, *N. exhalans*, *N. prasina*, *N. listeri*, 处于同一菌群, 虽然其与后者相似性为 97.98.% (> 97%), 但在生理学特性等方面, 它们之间的差别均较大, 因此其有可能独立成为拟诺卡氏菌属的一个新种。菌株 YIM 90012 与拟诺卡氏菌属中的一个种 *N. dassonvillei* 相似性为 100%, 而且二者之间在形态、生理学特性等方面均差别很小, 因此二者可作为同一个种。

在所有分离的嗜盐放线菌菌株中, 仅有 YIM 90017、YIM 90018 属于链霉菌科 (Streptomycetaceae), 链霉菌属 (*Streptomyces*)。从 16S rDNA 序列分析结果看, 菌株 YIM 90017 仅与链霉菌属的一个种——印度尼西亚链霉菌 (*Streptomyces indonesiensis*) 的相似性大于 97% (为 97.95%) 之外, 其余均低于 97%。另外, 从形态、生理学特性等方面做比较, 二者均差别较大, 因此可将其定为链霉菌属的一个新种。但这还要通过对菌株 YIM 90017、*S. indonesiensis* 进行进一步研究才能最终确定其分类地位。

### 3 结束语

有关嗜盐放线菌的分类标准、嗜盐放线菌的分离、分布、生理学及系统分类学研究的历史、国内外研究现状及其发展趋势、应用前景等, 本文作者曾做过综述报道<sup>[15]</sup>, 在此就不一一赘述。

近些年来, 随着分子生物学技术的发展, 人们对包括嗜盐菌在内的微生物多样性的认识均有较大的提高。现在国外普遍采用的是结合纯培养技术、分子生物学和化学分析手段等在内的综合分析方法<sup>[16]</sup>。目前国内的一些科研单位也在积极创造条件, 朝这种方向发展来研究不同生态环境中的微生物多样性。但同嗜盐细菌相比, 国内外对嗜盐放线菌的研究要少得多, 历史要晚的多。而且到目前为止, 还没有有关采用多种方法进行嗜盐放线菌生物多样性研究的报道。

我们对从新疆、青海等地采集的数份盐碱土样或泥样, 设计尽可能多的培养基进行嗜盐放线菌的分离, 并对其生物多样性进行初步研究。从对所分离的中度嗜盐放线菌菌株进行初步鉴定的结果来看, 我国新疆、青海盐碱地的中度嗜盐放线菌存在较为丰富的多样性。其中分离到的菌株分别属于 3 个科、5 个属中的约 10 余个种。迄今为止, 国内外所

有效发表的嗜盐放线菌新种、新属中我们就占了近一半以上。但同其它放线菌的研究相比, 我们在嗜盐放线菌的富集、分离和培养方法等方面的经验都不是太多, 均有很多地方值得今后进一步深入研究。

另外, 我们教育部微生物资源开放研究重点实验室正在积极总结经验, 利用我们分离到的嗜盐放线菌新的分类单元, 设计新的探针, 采用多种分子生物学手段, 同时结合纯培养技术, 来研究我国西北地区高盐碱环境中嗜盐放线菌的生物多样性。

### 参 考 文 献

- [1] 唐蜀昆, 李文均, 张永光, 等. 嗜盐放线菌生物学特性初步研究. 微生物学通报, 2003, 30(4): 15 - 19.
- [2] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, 29: 319 - 322.
- [3] Williams S T. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 4. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1989.
- [4] Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Letter in Applied Microbiology*, 2001, 33: 17 - 20.
- [5] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82 - 84.
- [6] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24: 4876 - 4880.
- [7] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406 - 425.
- [8] Page R D M. TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996, 12: 357 - 358.
- [9] Li W J, Xu P, Tang S K, et al. *Präuserella halophila* sp. nov. and *Präuserella alba* sp. nov., two new moderately halophilic actinomycetes isolated from the saline soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 1545 - 1549.
- [10] Li W J, Tang S K, Stackebrandt E, et al. *Saccharomonospora paurorometabolica* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from soil in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 1591 - 1594.
- [11] Cui X L, Mao P H, Tseng M, et al. *Streptomonospora salina* gen. nov., a new member of the family Nocardioseae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 357 - 363.
- [12] Li W J, Xu P, Zhang L P, et al. *Streptomonospora alba* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from soil in the west of China, and emended description of the genus *Streptomonospora* Cui et al. 2001. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53: 1421 - 1426.
- [13] Chun J, Bae K S, Moon E Y, et al. *Nocardioopsis kunsanensis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete isolated from a saltern. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50: 1909 - 1913.
- [14] Li M G, Li W J, Xu P, et al. *Nocardioopsis xinjiangensis* sp. nov. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- a halophilic actinomycete isolated from a saline soil samples in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003 **53** 317 - 321.
- [ 15 ] 张永光 李文均 姜成林 等. 嗜盐放线菌的研究进展. 微生物学杂志. 2002 **22** ( 4 ) : 45 - 48.

- [ 16 ] Oren A. Diversity of halophilic microorganisms : Environments , phylogeny , physiology , and applications. *J Indust Microbiol & Biotech*, 2002 **28** : 56 - 63.

## A Primary Study on Biodiversity of Moderately Halophilic Actinomycetes in Xinjiang and Qinghai Area

LI Wen-Jun\* TANG Shu-Kun WANG Dong XU Li-Hua JIANG Cheng-Lin

( Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education , Yunnan Institute of Microbiology , Yunnan University , Kunming 650091 , China )

**Abstract** : Some soil and muddy samples were collected from areas of Xinjiang and Qinghai in the west of China. 8 and 32 moderately halophilic actinomycete strains were isolated respectively using Starch-Casein agar , Glycerol-Asparagine agar and Soil-extract agar media. Then 14 strains were chosen for 16S rDNA amplification and systematic analysis based on comparison results with their morphology , physiological characteristics and whole cell-wall amino acids analysis. There were at least 5 genera and more than 10 species of moderately halophilic actinomycetes recovered from Xinjiang and Qinghai from the view of biodiversity , Such as genus *Nocardioopsis* and genus *Streptomonospora* of the family *Nocardioopsaceae* , genus *Prauserella* and genus *Saccharomonospora* of the family *Pseudonocardiaceae* , genus *Streptomyces* of the family *Streptomycetaceae* . In addition , the variety from Xinjiang was much higher than from Qinghai area.

**Key words** : Halophilic actinomycetes , 16S rDNA , Biodiversity

Foundation item : National Natural Science Foundation of China ( 30270004 ) ; Yunnan Provincial Natural Science Foundation ( 20001 C001Q ) ; Yunnan Education Commission Foundation ( 01111134 02QJ077 ) ; Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education , P. R. China.

\* Corresponding author. Tel 86-871-5033790 ; Fax 86-871-5173878 ; E-mail : liact@hotmail.com

Received date : 05-06-2003

### 《微生物学报》第八届编辑委员会名单

主 编 : 李季伦 院 士 中国农业大学生物学院  
 副主编 : 谭华荣 研究员 中国科学院微生物研究所  
 陆德如 研究员 第二军医大学遗传研究所  
 王敖全 研究员 中国科学院微生物研究所  
 曲音波 教 授 山东大学生命科学学院  
 徐建国 研究员 中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所

编 委 ( 按姓名拼音排序 , \* 2003 年 7 月新增补 )

蔡永峰	陈永青	程 池	东秀珠	范云六	郭 俊	胡福泉
胡远扬	黄 力	陆承平	闵 航	钱世钧	邵一鸣	盛 军
唐 宏	田 波	王 平	* 王华明 ( USA )	谢 红	杨苏声	翟中和
* 张耀平 ( USA )	郑天凌	朱宝泉	诸葛健			

编 辑 : 王晋芳 王 敏