

# 西藏地区土壤放线菌种群多样性及拮抗活性研究

罗红丽<sup>1,2</sup> 黄英<sup>2\*</sup> 王黎明<sup>2</sup> 刘志恒<sup>2</sup> 谢建平<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 西南师范大学生命科学学院 现代生物医药研究所 重庆 400715)

(<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所 微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100080)

**摘要:** 从西藏不同海拔、不同气候条件的 5 个地区采集的 10 份土样中,使用选择分离培养基、ISP 2( Yeast extract-malt extract agar )和高氏一号培养基,通过分散差速离心法( Dispersion and differential centrifugation, DDC )分离得到放线菌 156 株。根据形态和培养特征将其归入 32 个类群,并从中选出 65 个代表菌株进行全细胞壁氨基酸组分分析,结果表明 9 株菌为非链霉菌胞壁类型,其余为链霉菌胞壁类型。16S rDNA 扩增片段长度多态性( ARDRA )分析得到不同带型,对其序列分析结果表明,分离菌株分属链霉菌属( *Streptomyces* )和 5 个稀有放线菌属。同时测试了代表菌株抗耐药细菌和真菌的活性,其中 38.5% 的菌株具有拮抗活性。

**关键词:** 西藏地区 放线菌 ARDRA 种群多样性 拮抗活性

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2005)05-0724-04

放线菌作为一类具有重要经济价值的微生物资源,不仅可以产生抗生素、酶制剂和免疫调节剂等多种生物活性物质<sup>[1]</sup>,而且在诸如芳烃类大分子化合物的降解循环中也起着非常重要的作用<sup>[2,3]</sup>,因而得到了微生物学家的普遍关注和广泛研究。

西藏地域辽阔、具有得天独厚的气候条件。高海拔、低气温、长日照、强辐射赋予了该地区丰富的土壤微生物资源。近年研究该地区放线菌在不同生境中的生态分布规律,大多采用传统分类方法<sup>[4,5]</sup>。本文选择从西藏地区采集的酸性土壤样品,将分离菌株的表型与基因型结合起来研究其放线菌的组成及拮抗活性,希望能为进一步理清该地区土壤放线菌的资源状况提供证据,为寻找生物活性放线菌提供线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土壤样品:** 采自西藏林芝、米林、察隅、波密、工布江达 5 个地区,海拔 2700 ~ 4300m,采样时间为 2004 年 7 月,样品于 4 °C 保藏。土壤概况见表 1。

**1.1.2 主要试剂:** DAP 标样、PCR 试剂和限制性核酸内切酶分别购自 Sigma、上海申能和 NEB 公司。

**1.1.3 测试菌:** 耐药大肠杆菌( *Escherichia coli* )、肺炎克雷弗氏菌( *Klebsiella pneumoniae* )、绿脓杆菌

表 1 土样概况

Table 1 General situation of soil samples

Sample	Location	Vegetation	pH
1	Tiger Mountain, Linzhi region	Bamboo	5.2
2	Yongjiu Channel, Linzhi region	Deadwood	5.0
3	Lulang Town, Linzhi region	Birch	5.0
4	Sejila Mountain, Linzhi region	Fir	4.9
5	Zharao Village, Milin region	Alpine robur	5.2
6	Zharao Village, Milin region	Fern	5.2
7	Luoba Village, Chayu region	Pine	5.1
8	Basongcuo Lake, Linzhi region	Alpine robur	5.0
9	Dongji Town, Bomi region	Pine	5.0
10	Gongbujiangda region	Cole and Pea	5.4

( *Pseudomonas aeruginosa* )、金黄色葡萄球菌( *Staphylococcus aureus* )、表皮葡萄球菌( *Staphylococcus epidermidis* )来自潍坊医学院;烟曲霉( *Aspergillus fumigatus* )、白色念珠菌( *Candida albicans* )、尖孢镰孢霉( *Fusarium oxysporum* )、绿色木霉( *Trichoderma viride* )来自中国普通微生物保藏中心( CGMCC )。

**1.1.4 分离培养基:** 选择分离培养基参照文献[6],ISP 2( yeast extract-malt extract agar )和高氏一号培养基。培养基加入放线菌酮和重铬酸钾,终浓度为 50 μg/mL。

### 1.2 菌株分离培养、纯化及保藏

采用分散差速离心法<sup>[6]</sup>( Dispersion and differential centrifugation, DDC ),上清作梯度稀释涂布

基金项目: 国家 863 计划( 2004AA227100 )

\* 通讯作者。Tel 86-10-62553628, E-mail huangy@im.ac.cn 86-23-68254062 jianpingxie@vip.sina.com

作者简介: 罗红丽( 1975 - )女,重庆北碚人,硕士研究生,主要从事放线菌系统分类学研究。

其他作者: 胡昌华<sup>1</sup>

收稿日期: 2005-04-14, 修回日期: 2005-06-06

于分离培养基上。平板置 28℃ 培养 15d 后,挑单菌落至 ISP 2 培养基上纯化,并刮取纯培养物于 20% 甘油中 -20℃ 保藏。

### 1.3 形态及培养特征观察

使用 ISP 2 培养基和插片法。显微镜观察形态,肉眼观察培养特征,记录气丝、基丝、色素和孢子丝吸水情况等<sup>[7]</sup>。

### 1.4 pH 梯度生长试验

参照文献[6]进行。用柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液分别配制 pH 为 3.5、4.5、5.5、6.5 和 7.5 的 ISP 2 培养基,接种孢子悬液。

### 1.5 全细胞壁氨基酸分析

采用 Hasegawa 的薄层层析法<sup>[8]</sup>(Thin layer chromatography)进行全细胞壁二氨基庚二酸(DAP)组分分析。

**1.6 基因组 DNA 的提取和 16S rDNA 的 PCR 扩增**  
按 Chun 等<sup>[9]</sup>的方法提取总 DNA 和 PCR 扩增 16S rDNA,引物为通用保守引物 27f 和 1495r。

### 1.7 ARDRA 分析

参照文献[10]进行。限制性核酸内切酶为 *Bst*U I 和 *Hha* I,酶切产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

### 1.8 抗耐药细菌和真菌活性测试

采用琼脂移块法<sup>[11]</sup>进行。

### 1.9 16S rDNA 测序及序列分析

测序由北京诺赛基因组研究中心完成。测序结果与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对,确定分离菌株的分类地位。

## 2 结果

### 2.1 分离菌株的形态特征

从 10 份土样中分离得到形态或培养特征各异的放线菌 156 株,根据气丝、基丝、色素颜色和孢子丝吸水情况归入 32 个不同类群,从中选出代表菌 65 株。其中 56 株具有柔曲、螺旋或顶端卷曲呈球状的孢子链,基丝无横隔、不断裂,与链霉菌形态相似;另外 9 株气丝稀少,不形成孢子链或基丝、气丝断裂,与链霉菌明显不同。

### 2.2 pH 测试

所有代表菌株的最适生长 pH 均为 5.5~6.5。pH 3.5 除两株菌生长较弱外,其余菌均不生长,这两株菌同时也在 pH 7.5 生长;pH 4.5 有 9 株不生长,其中 4 株在 pH 7.5 不生长;pH 7.5 仅 4 株不生长。可见分离菌株绝大部分属于中度嗜酸放线

菌<sup>[12~14]</sup>。

### 2.3 胞壁氨基酸分析

65 个代表菌株有 4 种不同的氨基酸组成:① 1 株(菌株 9)含 meso 和 DD-DAP;② 8 株(菌株 1、5、14、17、20、22、36、39)只含 meso-DAP;③ 25 株含 LL 和痕量 meso-DAP;④ 31 株只含 LL-DAP。结合形态和 DAP 组成,可以确定①和②的 9 株菌属于链霉菌以外的稀有放线菌。

### 2.4 ARDRA 及 16S rDNA 序列分析

代表菌株的 16S rDNA 分别经 *Bst*U I 和 *Hha* I 酶切后,得到 9 和 11 种不同的酶切图谱(图 1)。选择酶切图谱带型不同的菌株进行的 16S rDNA 序列分析,结果表明:图 1-A 中带型 1~5 为链霉菌(其中带型 2、3、4 相同),6~9 为诺卡氏菌、10 为拟无枝酸菌、11 为微杆菌。图 1-B 中带型 1~3 为链霉菌、4~7 为诺卡氏菌、8 为假诺卡氏菌、9 为拟无枝酸菌、10 为微杆菌、11 为小单孢菌。可见两种酶均可在属级水平上对分离菌株进行鉴定,但 *Bst*U I 不能将小单孢菌和假诺卡氏菌同其他属的菌区分开来,其分辨率不如 *Hha* I 高。分离菌株的分类从属关系见表 2。

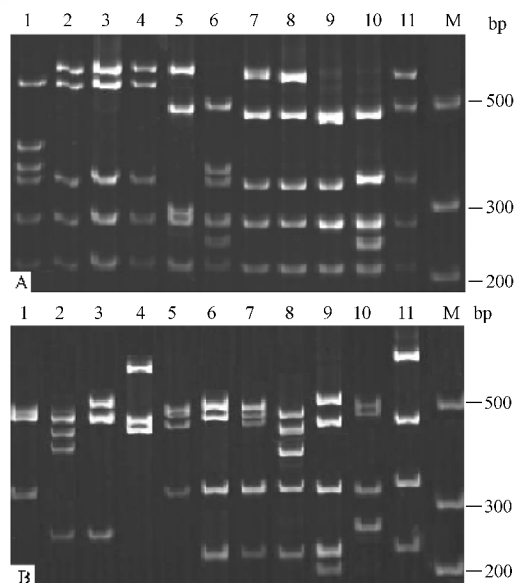


图 1 代表菌株 16S rDNA 的 *Bst*U I (A) 和 *Hha* I (B) 限制性酶切图谱

Fig. 1 Restriction patterns of 16S rDNA of representative strains digested with *Bst*U I (A) and *Hha* I (B)

M. 100bp DNA ladder.

A : 1. Strain 16 2. Strain 58 3. Strain 35 4. Strain 21 5. Strain 7 6. Strain 22 7. Strain 5 8. Strain 17 9. Strain 1 10. Strain 20 11. Strain 13.

B : 1. Strain 35 2. Strain 54 3. Strain 16 4. Strain 1 5. Strain 22 6. Strain 17 7. Strain 5 8. Strain 14 9. Strain 20 10. Strain 13 11. Strain 9.

表 2 根据 ARDRA 和序列分析所得的分离菌株的分类从属关系

Table 2 Phylogenetic affiliations of isolates based on ARDRA and 16S rDNA sequence

No. of representative strains	The number of isolates assigned to this group	Genus	The closest species/strain	Identities of 16S rDNA/%
7, 16, 21, 35, 54, 58	146	<i>Streptomyces</i>	-	97.6 ~ 99.9
1, 5, 17, 22	6	<i>Nocardia</i>	-	99.3 ~ 99.7
9	1	<i>Micromonospora</i>	<i>M. carbonacea</i>	99.8
20	1	<i>Amycolatopsis</i>	<i>A. azurea</i>	100
13	1	<i>Microbacterium</i>	<i>M. oxydans</i>	99.3
14	1	<i>Pseudonocardia</i>	<i>P. antarctica</i>	99.9

## 2.5 抗菌活性测试

65 株代表菌对 G<sup>-</sup> 菌均无拮抗活性。25 株对 G<sup>+</sup> 菌或真菌有拮抗活性,其中拟无枝酸菌(菌株 20)对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、白色念珠菌、尖

孢镰孢霉和绿色木霉有拮抗活性;诺卡氏菌(菌株 17)仅对尖孢镰孢霉有拮抗活性;其余为链霉菌,其拮抗活性见表 3。小单胞菌、假诺卡氏菌和微杆菌对所有测试菌均无拮抗活性。

表 3 链霉菌抗菌活性试验

Table 3 Antimicrobial activity test of *Streptomyces*

Test bacterium	The number of active strain	Strain No.
<i>Escherichia coli</i> (G <sup>-</sup> )	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (G <sup>-</sup> )	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (G <sup>-</sup> )	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (G <sup>+</sup> )	8	12, 15, 21, 29, 40, 41, 48, 58
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (G <sup>+</sup> )	8	12, 15, 21, 34, 40, 41, 54, 65
<i>Aspergillus fumigatus</i>	7	12, 29, 54, 58, 59, 60, 65
<i>Candida albicans</i>	6	12, 23, 34, 54, 55, 60
<i>Fusarium oxysporum</i>	8	15, 24, 29, 40, 43, 45, 54, 65
<i>Trichoderma viride</i>	16	12, 16, 23, 29, 34, 43, 45, 53, 54, 55, 57, 58, 59, 60, 61, 65

## 3 讨论

从土壤基质看,10 号土样为菜地土壤,其余都是自然土壤。从 10 号土样分离到 42 株不同的放线菌,占分离菌株总数的 26.9%,说明菜地土壤由于人为耕作土壤肥沃、透气性好,其中放线菌数量较自然土壤多,这与徐丽华等人的研究结果一致<sup>[15]</sup>。

随着分子生物学的发展,16S rDNA 成为放线菌分类的“黄金标准”,随之经典的分类方法受到冲击和挑战。然而通过分子手段进行分类鉴定较传统方法资金花费多、仪器要求高,对于大量菌株的初步分类,形态观察和胞壁分析还是有其优势。本实验选取的形态不同于链霉菌、胞壁不含 LL-DAP 的菌株,经序列分析全是链霉菌以外的稀有放线菌,说明以上两种传统分类方法用于区分链霉菌和非链霉菌具有很高的可信度。

由于放线菌的 GC 含量较高,进行 ARDRA 分析时所选两种酶的酶切位点都是只含 GC 的特异序列。从结果看,两种酶均可在属级水平上对分离菌株进行鉴定,但 *Bst*U I 不能将小单胞菌和假诺卡菌同其他属的菌区分开来,所以限制性内切酶 *Hha* I

比 *Bst*U I 的分辨率高,可在属级水平上区分更多的分离菌株。由于链霉菌属和诺卡氏菌属较大,这两种酶均可将这两个属内的部分菌株在种水平上进行区分。

检测菌株的抗菌活性有望获得产生新次生代谢产物的活性菌株,继而找到具有重要经济实用价值的生物活性物质。从抗菌活性结果看(1)拮抗 G<sup>+</sup> 菌的放线菌比拮抗 G<sup>-</sup> 菌的多,这与薛泉宏等人的研究结果一致<sup>[16]</sup>。(2)拮抗真菌的放线菌比拮抗细菌的多。由于大多数真菌分布在偏酸性土壤中,其中的放线菌可能是极具潜力的抗真菌活性物质的产生者。我们所用的土壤样品均偏酸性,故结果证实了这一推论。(3)拟无枝酸菌是多种抗生素的产生菌,具有广泛的抗菌活性,对 G<sup>+</sup> 菌有明显作用,这与有关文献报道结果一致<sup>[17,18]</sup>。因此除了链霉菌,拟无枝酸菌也应成为值得关注的产生生物活性物质的放线菌群。

因试验所用的分离方法和培养手段有限,推测土壤中还有一些未知的稀有或不可培养放线菌分布。我们正通过 DGGE 等非培养方法对该土样作进一步研究,以期更客观地反映该地区土壤放线菌分

布情况,为更好地开发该地区的放线菌资源提供可靠依据。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所刘杏忠教授提供土壤样品。感谢潍坊医学院赵乃昕教授提供耐药细菌测试菌。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Bull A T ,Goodfellow M ,Slater J H ,et al . Biodiversity as a source of innovation in biotechnology . *Annu Rev Microbiol* ,1992 ,**46** :219 - 252 .
- [ 2 ] Xue Y ,Sun X ,Zhou P ,et al . *Gordonia paraffinivorans* sp. nov. , a hydrocarbon- degrading actinomycete isolated from an oil-producing well . *Int J Syst Evol Microbiol* 2003 **53** :1643 - 1646 .
- [ 3 ] Lee S B , Strand S E , Stensel H D , et al . *Pseudonocardia chloroethenivorans* sp. nov. , a chloroethene-degrading actinomycete . *Int J Syst Evol Microbiol* 2004 **54** :131 - 139 .
- [ 4 ] 薛泉宏 ,谭志远 . 西藏土壤放线菌初步研究 . 西北农业大学学报 ,1999 **27** ( 1 ) :28 - 32 .
- [ 5 ] 张晓琳 ,朱铭莪 . 西藏草毡土中放线菌资源与分类研究 . 西北农业大学学报 ,1997 **25** ( 6 ) :47 - 50 .
- [ 6 ] 王黎明 ,黄 英 ,崔庆峰 ,等 . 应用分散和差速离心法分离嗜酸和耐酸链霉菌的试验及评价 . 微生物学通报 ,2003 **30** ( 5 ) :104 - 106 .
- [ 7 ] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组 . 链霉菌鉴定手册 . 北京 :科学出版社 ,1975 .
- [ 8 ] Hasegawa T ,Takizawa M ,Tanida S . A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes . *J Gen Appl Microbiol* ,1983 ,**29** :319 - 322 .
- [ 9 ] Chun J ,Goodfellow M . A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequence . *Int J Syst Bacteriol* ,1995 **45** :240 - 245 .
- [ 10 ] 崔庆峰 ,王黎明 ,黄 英 ,等 . 酸性土壤中嗜酸稀有放线菌的多样性研究 . 微生物学报 ,2004 **44** ( 5 ) :571 - 575 .
- [ 11 ] 张 帆 ,岳莹玉 ,陶天申 . 神农架林区及自然保护区链霉菌拮抗性的研究( I ) . 华中农业大学学报( 增刊 ) ,1996 **22** :58 - 62 .
- [ 12 ] Seong C N ,Goodfellow M ,Ward A C ,et al . Numerical classification of acidophilic actinomycetes isolated from acid soil in Korea . *Kor J Microbiol* ,1993 **31** :355 - 363 .
- [ 13 ] Williams S T ,Flowers T H . The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic *streptomycetes* . *Microbios* ,1978 **20** :99 - 106 .
- [ 14 ] Kim S B ,Lonsdale J ,Seong C N ,et al . *Streptacidiphilus* gen. nov. , acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* ( Waksman and henrici ( 1943 ) AL ) emend . *Antoni van Leeuwenhoek* 2003 **83** :107 - 116 .
- [ 15 ] 徐丽华 ,姜成林 . 云南若干地区土壤放线菌区系及资源考察 . 微生物学报 ,1996 **36** ( 1 ) :48 - 52 .
- [ 16 ] 薛泉宏 ,蔡 艳 ,陈占全 ,等 . 青海高原东部土壤中拮抗性放线菌的生态分布特征 . 中国抗生素杂志 ,2004 **29** ( 4 ) :203 - 205 .
- [ 17 ] Kumimoto S , Lu J , Esumi H , et al . Kigamicins , novel antitumor antibiotics . I . Taxonomy , isolation , physico-chemical properties and biological activities . *J Antibiot* 2003 **56** :1004 - 1011 .
- [ 18 ] Kim B ,Sahin N ,Goodfellow M ,et al . *Amycolatopsis eurytherma* sp. nov. , a thermophilic actinomycete isolated from soil . *Int J Syst Evol Microbiol* 2002 **52** :889 - 894 .

## Study on population diversity and antimicrobial activity of actinomycete from acidic soil in Xizang area

LUO Hong-li<sup>1,2</sup> HUANG Ying<sup>2\*</sup> WANG Li-ming<sup>2</sup> LIU Zhi-heng<sup>2</sup> XIE Jian-ping<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Modern Biopharmaceuticals ,School of Life Science ,South-West Normal University ,Chongqing 400715 ,China )

(<sup>2</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources ,Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China )

**Abstract** : 156 actinomycetes were isolated from 10 soil samples collected in Tibet by the method of DDQ ( dispersion and differential centrifugation ) . The isolates were assigned to 32 different groups on the basis of their morphological characters and colors of substrate mycelium ,aerial hyphae and pigment . The result of cell-wall DAP on 65 representative strains selected from these groups was that 9 strains were different from *Streptomyces* . The analysis of ARDRA and 16S rDNA sequences showed that the isolates belonged to the genus *Streptomyces* and five different rare actinomycete genera respectively . Antimicrobial activity of the representative strains was also tested , with the result that 38.5% isolates were positive .

**Key words** : Tibet ,Actinomycete ,ARDRA ,Population diversity ,Antimicrobial activity

Foundation item :National Programs for High Technology Research and Development of China ( 2004AA227100 )

\* Corresponding authors . Tel 86-10-62553628 , E-mail :huangy@im.ac.cn ; 86-23-68254062 , jianpingxie@vip.sina.com

Other author : HU Chang-hua<sup>1</sup>

Received date :04-14-2005