

盐碱环境放线菌多样性研究

姜 怡¹, 李文均¹, 徐 平^{1,2}, 唐蜀昆¹, 徐丽华^{1*}

(¹ 云南大学云南省微生物研究所教育部微生物资源重点实验室 昆明 650091)

(² 华北制药集团新药中心 石家庄 050015)

(³ 河北大学生命科学学院 保定 071002)

摘 要 放线菌因产生多种多样的生物活性物质而受到重视。但极端环境放线菌的研究甚少。采用 DGGE、纯培养法,重点研究了新疆、青海及埃及的重盐碱环境的放线菌分布情况、种类组成、生物学特性。发现了 1 个新科、8 个新属及 30 多个新种。从嗜(耐)盐碱放线菌筛选到许多带有 PKS 基因的菌株。认为极端环境放线菌是生物活性物质的重要来源,改进分离程序,分离未知放线菌,是放线菌多样性研究及开发利用的前提之一,并对极端环境放线菌研究作了论述。

关键词 极端环境 放线菌多样性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)02-0191-05

地球上,广泛分布着高、低温、高盐、碱、高酸、高压、高辐射等天然极端环境,如高温热泉、南极北极、雪山、重盐碱地、盐湖、深海、放射性矿物地区等。在这些极端环境中生存着嗜极微生物(extremophiles),在生命进化历程中,由于适应环境的结果,它们形成极为特殊的生理机制,并产生特殊的代谢产物,如多种多样的特殊酶类(耐热酶、碱性酶等)及各种生物活性物质,具有广泛的应用价值。同时,它们必然具有独特的基因类型,在生命进化及系统发育等研究中也具有重要的理论意义^[1,2]。从 20 世纪 70 年代开始,极端微生物已成为国际研究的热门领域,导致了三域学说^[3,4]的建立,加深了对生命现象的认识。相对极端环境细菌的研究而言,国内外对极端环境放线菌的研究却非常少。

最近几年,许多实验室用分子手段研究环境微生物多样性的结果表明,土壤环境存在大量未知(未获得纯培养、未经鉴定)的微生物,可培养的微生物仅为 1%,甚至更少^[5-8]。因此,提出新的思路,设计新的分离程序,分离未知微生物,就成了微生物资源开发利用的重要前提和关键之一。

我国新疆、青海广泛分布重盐碱环境,有的地区地表含盐量高达 58%。还有众多的盐湖。这些天然环境为我们研究其中的放线菌提供了得天独厚

的条件。本文报告近几年我室关于新疆、青海以及埃及重盐碱环境放线杆菌(Actinobacteria)研究的部分结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:2001 年 4 月,从新疆焉耆县黄水渠、盐湖边重盐碱土壤采集土样 21 份。2002 年 8 月,从青海茶卡盐湖、柯柯盐湖及沿岸采集湖泥及盐碱土样 120 份。9 月从新疆布尔津、甘家湖、小盐湖、博斯骑湖、库车阿艾湖等地采集盐碱土 42 份。2003 年 12 月收集 32 份埃及盐碱土样。

1.1.2 培养基:①淀粉-酪素琼脂:淀粉 10g,酪素 0.3g, KNO₃ 2g, MgSO₄·7H₂O 0.05g, K₂HPO₄·3H₂O 2g, CaCO₃ 0.02g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, 琼脂 20g, 补水到 1000mL。②甘油-门冬酰胺琼脂:甘油 10g, 门冬酰胺 1g, K₂HPO₄·3H₂O 2g, 微量盐(FeSO₄·7H₂O 0.1g; MnCl₂·4H₂O 0.1g; ZnSO₄·7H₂O 0.1g, 水 100mL) 1mL, 琼脂 20g, 补水到 1000mL。③土壤浸汁琼脂:土壤浸汁(土壤 1000g, 水 2500mL, 120℃ 1h, 离心, 用上清液)1000mL, 牛肉膏 3g, 蛋白胨 5g, 琼脂 20g。④ Horikoshi-I 培养基:葡萄糖 10g, 酵母抽提物 5.0g, 多价胨 5.0g, K₂HPO₄ 1.0g,

基金项目: 国家 973 项目(2004CB719601) 科技部基础研究重大项目前期研究专项(2002CB0001P) 国家自然科学基金(30270004, 3056001)

* 通讯作者。Tel: 86-871-5035263; Fax: 86-871-5173878; E-mail: jlihxu@ynu.edu.cn

作者简介: 姜 怡(1978-), 女, 云南人, 博士研究生, 研究方向为放线菌分类。

其他作者: 张玉琴¹, 张永光¹, 张利平³

收稿日期: 2005-05-27 接受日期: 2005-07-06 修回日期: 2005-07-18

MgSO₄·7H₂O 0.2g,琼脂 20g,补水到 1000mL。所有培养基的 pH 都用 NaCO₃和 NaOH 调到 pH 12,使培养基具有较强的缓冲性,以分离嗜碱菌;或加 20%~25%的 NaCl(或 KCl)以分离嗜盐菌。培养温度 28℃。

1.1.3 主要试剂和仪器: *Taq* 酶来自 Applied Biosystems, Foster City, California。PCR 扩增仪(美国生科公司)475 梯度凝胶系统(Bio-Rad); SMTM 377 DNA 序列分析仪(Applied Biosystems, Inc.)。

1.2 DGGE 法(变性梯度凝胶电泳, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)测定未知菌

1.2.1 总 DNA 的提取、扩增:用酶解法和化学裂解法结合提出 DNA 后,用细菌 16S rDNA 通用引物(正向引物 8-27F,反向引物 :1429-1445R)进行扩增。反应条件为 :94℃ 5min ;94℃ 1min,退火 1min,72℃ 3min,35 个循环 ;72℃ 10min。其中退火温度分别为 52、53、54、56 和 58℃。

1.2.2 DGGE 电泳:用细菌的 16S rDNA 通用引物 [正向引物 341F-GC,反向引物 907R(每条引物实际为 20 个碱基,正向引物末端附加 40 个 GC 碱基)],扩增出用于 DGGE 电泳的片段。反应条件为 :94℃ 5min ;先进行 20 个循环的降落 PCR(94℃ 1min,退火 1min,72℃ 3min,退火温度由 58℃ 到 48.5℃ 依次递降);再进行 15 个循环(94℃ 1min,48℃ 退火 1min,72℃ 3min);72℃ 10min。DGGE 电泳条件为 :6%的聚丙烯酰胺胶,30%~62.5%的变性剂梯度(7mol/L 的尿素,40%的甲酰胺为 100%的变性剂浓度),120V 恒定电压,60℃ 下电泳 8h。

1.3 菌种分离

1.3.1 土壤预处理:土壤样品经 120℃ 干热处理 1h 或不处理。

1.3.2 抑制剂:培养基加入 50mg/L 的重铬酸钾,或 100mg/L 的制霉菌素和 20mg/L 的萘啶酮酸作为抑制剂,或不加抑制剂。所有样品都采用平板稀释法分离放线细菌。

1.4 耐盐碱性试验

用酵母膏-麦芽膏液体培养基^[9],用 0.05mol/L 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液配制、NaOH 和 HCl 分别调至不同的 pH 值,或加入不同种类、不同浓度的盐类,并分装试管,接种后,28℃ 培养 7d 和 15d,观察生长情况。

1.5 菌种分类鉴定

1.5.1 形态学研究:使用酵母膏-麦芽膏琼脂,28℃ 培养 7、15d,形态特征用显微镜和电子的显微镜

(EPMA-8705)观察,拍照。培养特征,生理生化特征按照 Shirling & Gottlieb^[9]的方法进行。斜面菌体颜色与 ISCC-N No. 2106 色卡^[10]比较。

1.5.2 细胞壁组成:按 Lehevalier&Lechevalier^[11]的方法进行。

1.5.3 16S rDNA 序列分析:菌株染色体的 DNA 依照 Hopwood 等^[12]的程序提取。引物 A 为 8-27(5'-CCGTCGACGAGCTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 B 为 1523-1504r(5'-CCCGGTACCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3',引物的碱基位置在大肠杆菌的相应位置^[13])。PCR 反应条件 :95℃ 10min ;95℃ 1min,56℃ 1min,72℃ 3min,35 个循环 ;72℃ 5min。1.5kb 的 16S rDNA 扩增片段用琼脂糖凝胶纯化。测序引物 :KMS098PB1r(5'-TAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), KMS584P1r(5'-TGCTGGCAACACAGAACAAAG-3') 和 MS584P2r(5'-ACTCTGCCTGCCCCG TATCG-3')。

1.5.4 排序及构件系统进化树:用 Blast 软件在 GenBank 进行相似性搜索,获取相近菌种的 16S rDNA 基因序列。用 Clustal X^[14]程序进行比对,根据 Kimura^[15]模型 2 计算进化距离,用邻接法^[16]构建系统进化树^[17]。拓扑分析为 1000 次重复取样的结果,生成的树用 Treeview 重建。

1.6 PKS 基因产生菌的筛选

用微波法^[18]提取 DNA。用大环聚酮类基因 PKS 的 KS 基因区引物 K1 和 AT 基因区引物^[19]进行 PCR 扩增。

2 结果和讨论

2.1 DGGE 法和纯培养法获得的结果

用 DGGE 法检测茶卡盐湖 4 个底泥样品的细菌多样性,电泳谱上至少有 40 不同的条带,表明茶卡盐湖至少存在 40 种不同的细菌(含放线菌)物种。相同的底泥样品用平板稀释法,仅分离到 16 株各不相同的纯培养菌株。并分别制备这 16 株纯培养菌的 DNA,再与底泥样品直接提取的 DNA 一同做 DGGE 电泳。结果发现,分离到的纯培养菌株仅占整个电泳谱的极狭窄的部分,而且芽孢杆菌科的比例较大,说明仍有绝大部分菌株不能用本实验使用的分离方法分离到纯培养。经过 16S rDNA 序列分析和多项分类,并与相关典型菌种比较,从这 16 株中,确定了 5 个新种,分别定名为 :*Halobacillus Opalescens* sp. nov. KN2, *Salibacillus halotolerans* sp. nov. KN3, *Amphibacillus halonhilus* sp. nov. KN10, *Gracilibacillus*

qinghaiensis sp. nov. KN13, *Salibacillus Qinghaiensis* sp. nov. KN16. 可能还有 1 个新属,有待进一步研究。这些结果说明,从极端环境中获取新的微生物物种的潜力极大。因此,提出新思想,设计新的分离方法,分离未知微生物,是微生物多样性研究及资源开发利用的重要前提之一。

2.2 嗜(耐)碱放线菌

从新疆、青海的重盐碱土、盐湖及埃及盐碱地采集的样品,用 pH 12 的培养基,共分离到 534 株放线菌,研究结果表明有如下特点:

(1) 有 87% 的菌株能在 pH 6.0 ~ 12 生长,说明它们是耐碱放线菌;有 14 株在 pH 7.0 不长,最适生长在 pH 8.5 ~ 11.5,这些菌株才是真正的嗜碱菌。所以,即使在高碱环境,嗜碱放线菌的数量也不会多。

(2) 所分离到的放线菌,以拟诺卡氏菌 (*Nocardopsis*) 和链霉菌 (*Streptomyces*) 为主,还有少量北里菌属 (*Kitasatosporia*) 和球菌目的成员。

(3) 菌株 YIM80305 对 KOH, K_2CO_3 , NaOH 和 Na_2CO_3 等几种碱性化合物的反应很不相同。用 KOH, K_2CO_3 调 pH 8.0 以上培养基,菌体就不能生长,说明这两种化合物对菌株的生长有显著的抑制作用,如果用 NaOH 调 pH,菌株可在 pH 11 生长;用 Na_2CO_3 调 pH,则可以在 pH 12 生长。当培养基加入 1 ~ 3% 的 NaCl,并用 KOH 调 pH 到 11,菌株也能生长;用 K_2CO_3 把 pH 调到 9.0,菌株也可以生长。可见低浓度的 NaCl 可以减轻 KOH、 K_2CO_3 对菌株生长的抑制。这种作用的机制有待进一步研究。

(4) 耐碱、嗜碱放线菌的碳源利用谱比普通放线菌要窄得多。惟有淀粉能被 95% 以上的菌株利用,七叶灵 (esculine) 可以被 80% 以上的菌株利用。所有菌株都能利用门冬酰胺。

(5) 利用多相分类方法对 34 株在 pH 值 7.0 不生长,而在 pH 8.5 ~ 11.5 条件下生长最好或较好的嗜碱菌株进行了系统分类,发现碱杆菌属 (*Alkalibacillus haloalkaliphilus* gen. nov.)^[20] 和纳西杆菌新属 (*Naxibacter alkalitolerans* gen. nov., sp. nov. YIM31775^T) 两个新属。发现 11 个新种:耐碱柠檬球菌 (*Citricoccus alkalitolerans* sp. nov. YIM70010^T), 云南红球菌 (*Rhodococcus yunnanensis* sp. nov., YIM70056^T), 嗜碱拟诺卡氏菌 (*Nocardopsis alkaliphila* sp. nov. YIM 80379^T), 藤黄涅斯捷连科氏菌 (*Nesterenkonia lutea* sp. nov., YIM 70081^T) 和橙黄

涅斯捷连科氏菌 (*Nesterenkonia sandarakina* sp. nov., YIM 70009^T)^[21], 产脂酶拟诺卡氏菌新种 (*Nocardopsis lipasogensis* sp. nov. YIM80028^T), 贫营养拟诺卡氏菌新种 (*Nocardopsis macra* sp. nov. YIM80034^T), 疆北拟诺卡氏菌新种 (*Nocardopsis jiangbeiensis* sp. nov. YIM80041^T), 耐冷拟诺卡氏菌新种 (*Nocardopsis frigitolerans* sp. nov. YIM80045^T), 其大部分都在国际微生物系统与进化杂志 (*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*) 发表或接收。这些结果表明,碱性环境获得的嗜碱放线菌,新物种很多。

2.3 嗜(耐)盐放线菌

我们从新疆、青海、埃及的重盐碱地、盐湖采集样品,用含有 20% ~ 25% NaCl 等盐类的培养基分离嗜盐放线菌。有关的研究结果简报如下:

(1) 从新疆盐碱地分离到的菌株中,嗜盐菌的比例大于盐湖中的。90% 从青海盐湖分离到的菌株能在没有 NaCl 的培养基中生长,他们应该是耐盐放线菌。而从新疆分离的菌株,仅有 12% 的菌株可以在无 NaCl 的培养基中生长;25% 的菌株在低于 5% NaCl 的培养基就不能生长,这些是嗜盐放线菌。

研究了 43 株菌对 Na, K, Mg, Ca 阳离子的反应。结果指出,所有的菌株均能在 15% ~ 20% 的 NaCl 培养液中生长,有 5% 的菌株低于 5% 的 NaCl 就不能生长;有 47% 的菌株能在 25% 的 KCl 的培养液中生长,其余 53% 的菌株能够在 20% KCl 中生长,有 12% 的菌株低于 5% 的 KCl 就不能生长;有 38% 的菌株能在 25% 的 $MgCl_2$ 培养液中生长,有 28% 的菌株可在 20% $MgCl_2$ 生长,有 7% 的菌株在低于 15% 的 $MgCl_2$ 时就不能生长;仅有 1 个菌株 (YIM90005) 能够在 15% 的 $CaCl_2$ 中生长,只有 3 株可以在 1% 的 $CaCl_2$ 中生长,有 91% 的菌株在培养基的 $CaCl_2$ 浓度超过 1% 就不能生长,这说明 $CaCl_2$ 对大多数的嗜盐菌有毒害作用。根据这些结果看来,过去仅以微生物对 NaCl 的耐受能力来划分嗜盐菌显然是不确切的。微生物对金属阳离子的反应肯定很复杂,其机制也可能互不相同,有待进一步研究。我们建议把嗜盐菌分为嗜钠菌,嗜钾菌,嗜镁菌,嗜钙菌和广谱嗜盐菌五种类型。如果分离到能在 15% 以上 $CaCl_2$ 生长良好的放线菌,新物种的可能性非常大。

(2) 从新疆分离到的菌株,有 20% 的菌株属于普氏菌属 (*Prauserella*), 5% 的菌株属于链单孢菌属 (*Streptomonospora*), 2.5% 的菌株属于糖单孢菌属

(*Saccharomonospora*) 7.5% 的菌株属于拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*) 其它为链霉菌(*Streptomyces*) 和微球菌目的菌种。从青海分离到的放线菌 90% 是拟诺卡氏菌属, 5% 为链霉菌属, 其余均为微球菌目的菌种。

(3) 大部分嗜(耐)盐放线菌株的碳源利用范围均较窄。

(4) 用多相分类方法对 60 多株进行了系统分类研究。发现新科 1 个, 为了纪念阎逊初先生, 将其定名为阎氏菌科(*Yaniaceae* nov. fam.), 同时还发现链单孢菌属(*Streptomonospora* gen. nov.)^[22], 阎氏菌属(*Yania* nov. gen.)^[23], 产丝菌属(*Myceligenans* gen. nov.)^[24], 姜氏菌属(*Jiangella* gen. nov.)^[25], 中华短杆菌属(*Sinocurtobacterium* gen. nov.), 中华球菌属(*Sinococcus* gen. nov.) 等 6 个新属, 和 20 多个新种。有关分类的论文已经在 Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 发表, 或在印刷, 或已接收。其中部分学名是: *Streptomonospora salina* sp. nov. YIM90002, *Streptomonospora alba* sp. nov. YIM90003, *Prauserella halophila* sp. nov., *Prauserella dehalogenans* sp. nov., *Nocardiopsis xinjiangensis* sp. nov.^[26], *Nocardiopsis arabinosum* sp. nov., *Corynebacterium halotolerans* sp. nov., *Nesterenkonia halophila* sp. nov., *Marinococcus halotolerans* sp. nov., *Marinococcus xinjiangensis* sp. nov., *Isoptericola halotolerans* sp. nov., *Yania flava* sp. nov., *Salinococcus aurantium* sp. nov., *Streptomyces beijiensis* sp. nov.^[27]。可见, 未知菌所占比例非常高。可以说, 原始重盐环境, 是研究放线菌多样性极为理想之地。

2.4 活性物质产生菌

我们用基因筛选方法, 从 1002 个放线菌, 筛选具有聚酮类化合物基因(PKS I)的菌株, 各类菌株的阳性率如下: 总阳性率 $124/1002 = 12\%$, 普通放线菌阳性率 $71/759 = 9.4\%$, 嗜盐放线菌阳性率 $7/46 = 15\%$, 嗜碱放线菌阳性率 $26/98 = 26.5\%$, 链霉菌阳性率 $20/99 = 20\%$ 。

一般认为链霉菌是 PKS I 型化合物基因的最主要的产生菌, 本实验结果显示, 嗜碱放线菌阳性率更高。

最近, 我们从 3 株嗜盐嗜碱放线菌分离到 10 个化合物, 其中有 3 个是新化合物, 其中一个抗肿瘤的活性很高, 一个具有抗氧化作用, 一个具有抑制乙酰胆碱酶活性。

参 考 文 献

- [1] Antranikian G, Aguilar A. First Meeting on Biotenchnology of Extremophiles. Hamburg: Technical University Hamburg-Harburg, 1993.
- [2] 姜成林, 徐丽华. 微生物资源学. 北京: 科学出版社, 1997.
- [3] Woese CR. Archaeobacteria. *Sci Am*, 1981, **244**: 98 - 122.
- [4] Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 1987, **51**: 221 - 271.
- [5] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 - 169.
- [6] Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **93**: 6578 - 6583.
- [7] Dunbar J, Bams SM, Ticknor LO, et al. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soil. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3035 - 3045.
- [8] Torsvik V, Ovreas L, Thingstad TF. Prokaryotic diversity magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 2002, **296**: 1064 - 1066.
- [9] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, **16**: 313 - 340.
- [10] Kelly KL. Inter-Society Color Council-National Bureau of standards color-name charts illustrated with centroid colors published in US. 1964.
- [11] Lechevalier MP, Lechevalier HA. The chemotaxonomy of actinomycetes. In: Dietz A, Thayer J. ed. Actinomycete Taxonomy. Arlington: Society for Industrial Microbiology, 1980, 22 - 291.
- [12] Hopwood DA. Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual. Norwich: John Innes Foundation, 1985.
- [13] Brosius J, Palmer ML, Kennedy JP, et al. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75**: 4801 - 4805.
- [14] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, **24**: 4876 - 4488.
- [15] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mole Evol*, 1980, **16**: 111 - 120.
- [16] Saitou N, Nei MT. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Bio Evol*, 1987, **4**: 406 - 425.
- [17] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, **39**: 783 - 791.
- [18] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. PCR 快速鉴定 Actinobacteria 三种模板制备方法的比较. 中国抗生素杂志, 2003, **28**(7): 388 - 390.
- [19] 徐平, 李文均, 张永光, 等. 产生大环聚酮类天然产物放线菌的分子筛选研究. 中国抗生素杂志, 2003, **28**(6): 321 - 324.

- [20] Jeon CO , Lim JM , Lee GS. *Lentibacillus salarius* sp. nov. , isolated from saline sediment in China , and emended description of the genus *Lentibacillus* . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2005 , **55** :1339 – 1343.
- [21] Li W , Cen H , Kim CJ , et al . *Nesterenkonia sandarakina* sp. nov. and *Nesterenkonia lutea* sp. nov. , novel actinobacteria , and emended description of the genus *Nesterenkonia* . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2005 , **55** :463 – 466.
- [22] Cui X , Mao P , Zeng M , et al . *Streptimonospora salina* gen. nov. , sp. nov. , a new member of the family Nocardiopsaceae . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2001 , **51** :357 – 363.
- [23] Li WJ , Chen HH , Xu P , et al . *Yania halotolerans* gen. nov. , sp. nov. , a novel member of the suborder Micrococccineae from saline soil in China . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2004 , **54** :525 – 531.
- [24] Cui X , Schumann P , Stackebrandt E , et al . *Myceligenans xiligouense* gen. nov. , sp. nov. , a novel hyphae-forming member of the family Promicromonosporaceae . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2004 , **54** :1287 – 1293.
- [25] Song L , Li W , Wang Q , et al . *Jiangella gansuensis* gen. nov. , sp. nov. , a novel actinomycete from a desert soil in north-west China . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2005 , **55** :881 – 884.
- [26] Li M , Li W , Cui X , et al . *Nocardiopsis xinjiangensis* sp. nov. , a halophilic actinomycete isolated from a saline soil sample in China . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2003 , **53** :317 – 321.
- [27] Li W , Cui X , Li M , et al . *Streptomyces beijiagensis* sp. nov. , a psychrotolerant actinomycete isolated from soil in China . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2002 , **52** :1695 – 1699.

Study on diversity of actinomycetes under salt and alkaline environments

JIANG Yi¹ , LI Wen-jun , XU Ping^{1,3} , TANG Shu-kun¹ , XU Li-hua^{1*}

(¹ Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education , Yunnan Institute of Microbiology , Yunnan University , Kunming 650091 , China)

(² New Drug Research and Development Center of North China Pharmaceutical Corporation , Shijiazhuang 050015 , China)

(³ College of Life Sciences , Hebei University , Baoding 071002 , China)

Abstract : Actinomycetes have been attracted a great attention owing to these microorganisms product various natural compounds and have special mechanism of adapting extreme environments. But the research work on actinomycetes under extreme environments is few. Soil and sediment samples were collected from saline and alkaline soil and lakes in Xinjiang , Qinghai Province , P. R. China and Egypt. Diversity and some biological characteristics of Actinomycete were studied by using cultivation and DGGE methods. Results showed that large amount of unknown microorganisms exist in the salt lake Chaka , isolated strains account for only a small portion of species diversity. Designing new strategies for isolation of as yet uncultured microorganisms from natural extreme environments is the key step to exploit microbial resources. The 87% of alkaliphilic or alkalinetolerant actinomycete strains were able to grow at pH 6.0 ~ 12.0. 14 strains grow well at pH 8.5 ~ 11.5 , but not at pH 7.0. 34 halotolerant actinomycete can grow in 15% ~ 20% NaCl. Based on the study of the halophilic and halotolerant actinomycetes isolated from the saline and the alkaline soils collected from Xinjiang and Qinghai Province , China , we can conclude that the relationship of actinomycetes (especially halophilic actinomycetes strains) to positive ions such as Na⁺ , K⁺ and Mg²⁺ is very complex , and there were sodiumphilic , kaliumphilic , magnesiumphilic , and calciumphilic actinomycete strains. One new family , eight new genera and more than 30 new species of halophilic and alkaliphilic actinomycetes were found. Many strains with PKS genes were selected. We believe based on the research results that there is a very high density of new or unknown actinomycete resources in these areas in China and Egypt.

Keywords : Salt and alkaline environments ; Actinomycete diversity

Foundation item : Major project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719601) ; National Natural Science Foundation of China (30270004 , 30560001)

* Corresponding author. Tel : 86-871-5035263 ; Fax : 86-871-5173878 ; E-mail : lihxu@ynu.edu.cn

Other authors : ZHANG Yu-qin¹ , ZHANG Yong-guang¹ , ZHANG Li-ping³

Received 27 May 2005 / Accepted 16 July 2005 / Revised 18 July 2005