

## 艾丁湖沉积物放线菌多样性

夏占峰<sup>1,3</sup>, 关统伟<sup>1,3</sup>, 阮继生<sup>2</sup>, 黄英<sup>2\*</sup>, 张利莉<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> 塔里木大学, 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, 阿拉尔 843300

<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 100101

<sup>3</sup> 塔里木大学生命科学学院, 阿拉尔 843300

**摘要** 【目的】为了研究新疆艾丁湖低海拔、高盐环境中的放线菌多样性。【方法】本研究应用基于 16S rRNA 基因序列系统发育分析的免培养方法和选择性分离培养方法相结合的方式对艾丁湖沉积物样品进行放线菌多样性分析。利用放线菌特异性引物扩增 16S rRNA 基因并构建了 16S rRNA 基因克隆文库, 对文库中的插入序列进行 RFLP( Restriction Fragment Length Polymorphism 限制性片段长度多态性) 分析。采用不同盐浓度的 9 种选择性培养基分离样品中的放线菌。【结果】通过对 16S rRNA 基因克隆文库分析, 273 个克隆分布于放线菌纲( Actinobacteria) 的放线菌亚纲( Actinobacteridae 208 个)、酸微菌亚纲( Acidimicrobiales 13 个) 和红色杆菌亚纲( Rubrobacteridae 52 个)。该环境中优势放线菌为微球菌科的罗斯氏菌属( *Rothia* ), 占到克隆总数的 37%。有 45.8% 的序列与已有效发表菌株的序列相似性小于 97%, 部分序列形成了几个独立的进化分支, 可能代表着放线菌新的类群。通过分离培养, 共得到 55 株放线菌, 分布在放线菌目的 6 个亚目中, 以链霉菌属( *Streptomyces*) 和拟诺卡氏菌属( *Nocardopsis*) 为主要类群。有 6 株菌的 16S rRNA 基因序列与已有效发表菌株的序列相似性小于 97%, 为潜在的放线菌新分类单元。【结论】研究表明, 艾丁湖中的放线菌具有较高的多样性, 并蕴藏着多种新类型, 有进一步研究价值。

**关键词:** 艾丁湖, 放线菌多样性, 免培养方法, 选择性分离

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 08-1023-09

极端环境的微生物经过长期的选择和适应, 形成了特殊的群落结构和多样性。但是绝大多数微生物目前尚不能被分离培养<sup>[1]</sup>, 一些生活在极端环境中的微生物更不容易分离得到。近年来, 随着研究方法的改进, 人们从极端环境中发现了越来越多的微生物新种类, 并从中发现了多种活性物质。放线菌是一类具有重要应用价值的微生物, 在抗生素和

酶制剂产业中具有重要地位<sup>[2]</sup>。极端环境中的放线菌因其可能的特殊性和新颖性受到越来越多的关注。

艾丁湖位于新疆吐鲁番盆地南部, 是内陆型咸水湖, 湖水矿化度最高可达到 20%, 海拔 -153.4 m, 是我国陆地最低点<sup>[3]</sup>。作为吐鲁番盆地水系的最后归宿地, 艾丁湖底沉积物是吐鲁番盆

基金项目: 国家“973 计划”前期研究专项(2010CB134505); 国家自然科学基金项目(31060003); 教育部科学技术重点项目(209145); 中国科学院微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题(SKLMR-20090603)

\* 通信作者。Tel: +86-40-64807311, Fax: +86-40-64807311, E-mail: huangy@im.ac.cn(黄英); Tel: +86-997-4681612, Fax: +86-997-4681612, E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn(张利莉)

作者简介: 夏占峰(1981-), 男, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事极端环境放线菌资源方面的研究。E-mail: fenge3721@163.com

收稿日期: 2011-02-01; 修回日期: 2011-04-03

地天然的微生物资源库。由于吐鲁番盆地干旱少雨,湖水补给来源日趋减少,目前该盐湖正趋于干涸,对艾丁湖微生物资源的保护和利用具有紧迫性。

免培养技术能够快速全面地调查环境中微生物的多样性,尤其是能获得难于分离培养的微生物的信息。本研究利用免培养的这一优势,来指导艾丁湖沉积物放线菌的分离培养。依据沉积物样品的化学组成有针对性的设计分离培养基,以最大限度的分离其中的放线菌,为保护和利用艾丁湖放线菌资源奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品的采集:** 2009年11月,从新疆吐鲁番市艾丁湖(81°40'E,36°43'N)采集湖底沉积物样品。在湖心及周围湖盆16个样点取样,取样深度为0-90 cm,样品采集后装于无菌的样品盒中,运抵实验室后分别保存在4℃和-20℃冰柜中。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** *Taq* DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、*Hae*III限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;PCR仪、凝胶成像分析系统购自美国BIO-RAD公司;离心机购自德国Eppendorf公司;电泳仪购自北京六一仪器厂;超净工作台和培养箱购自上海博讯实业有限公司。

### 1.2 样品组分的测定

样品的常规组分测定采用文献[4]中的方法。可溶性总盐采用残渣烘干法;氯离子含量用硝酸银滴定法;硫酸根离子、镁离子和钙离子含量用EDTA滴定法;钾离子和钠离子含量测定用火焰光度法。

### 1.3 免培养方法

**1.3.1 样品总DNA的提取和放线菌特异性序列的扩增:** 采用CTAB-SDS法<sup>[5]</sup>提取样品总DNA。用放线菌特异性引物<sup>[6]</sup>(S-20: 5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3', A-19: 5'-CCGTACTCCCCAGGCGGG-3')进行放线菌16S rRNA基因部分序列的PCR扩增。

**1.3.2 克隆文库的构建<sup>[7]</sup>:** 按照上海生工UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒说明将PCR扩增的目的条带割胶回收纯化。纯化后的PCR产物通过T4 DNA连接酶与pMD18-T载体连接,转化*E. coli* DH5 $\alpha$ 感

受态细胞。蓝白斑筛选,将白色克隆转接于96孔细胞培养板中,置于-70℃冰箱中保藏。

**1.3.3 克隆文库的检验及RFLP分析:** 对文库中的克隆用M13引物(M13-F: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3', M13-R: 5'-GTAAAACGACGGCAGT-3')进行菌体PCR,以检测插入子的正确性<sup>[8]</sup>。菌落PCR产物用限制性内切酶*Hae*III进行酶切,37℃酶切4 h。酶切产物用3%的琼脂糖凝胶电泳检测,电泳电压80 V,电泳时间为3 h。将RFLP图谱中条带有差异的阳性克隆送上海生工测序。

将测序获得的序列通过BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)与GenBank数据库中已知序列进行比对分析,去除非放线菌序列,再用MEGA 4.1软件对放线菌序列进行多重序列比对。以99.0%相似性为标准划分不同的操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)<sup>[9]</sup>。用Analytic Rarefaction软件(<http://www.uga.edu/strata/software>)绘制克隆文库的稀释曲线(Rarefaction curve),以检验文库的代表性。使用软件SPADE(Species Prediction And Diversity Estimation)进行放线菌多样性指数分析。

**1.3.4 系统发育分析:** 每个OTU选取一条代表序列,通过BLAST找到GenBank数据库中与之相近的已知放线菌类群的序列并下载。将OTU的代表序列和下载的序列用MEGA 4.1软件进行多重比对,采用Neighbor-Joining方法构建系统发育树。

### 1.4 分离培养方法

**1.4.1 稀释涂布平板法:** 称取1 g沉积物样品放入9 mL的无菌盐溶液中,充分振荡,做成10<sup>-1</sup>悬浊液。吸取0.1 mL悬浊液,均匀涂布于预先配制好的培养平板上,37℃倒置培养。培养皿采用保鲜膜封口,减少培养基水分散失,延长培养时间。

**1.4.2 培养基:** 采用1.5%、5%、10%、15%、20%、25%六个盐浓度梯度的9种培养基,根据样品的化学组成测定结果,培养基中加入氯化钠作为主要盐分。

(1) 淀粉酪素培养基<sup>[10]</sup>; (2) 酪素酵母培养基: 酸水解酪素5 g,酵母提取物5 g,柠檬酸三钠2 g,硫酸镁10 g,氯化钾2 g,琼脂粉17 g,水1000 mL, pH 7.5; (3) 壳聚糖天冬酰胺培养基: 壳聚糖4 g,酪素水解物2 g,天冬酰胺1 g,磷酸氢二钾1 g,硫酸镁1 g,

琼脂粉17 g,水1000 mL,pH 7.5;(4) 麦芽粉腐殖酸培养基: 麦芽粉5 g,酪素水解物2 g,腐殖酸0.5 g,磷酸氢二钾1 g,硫酸镁0.5 g,琼脂粉17 g,水1000 mL,pH 7.5;(5) 甘油精氨酸培养基: 甘油5 g,精氨酸1 g,磷酸氢二钾1 g,硫酸镁0.5 g,碳酸钙0.5 g,琼脂粉17 g,水1000 mL,pH 7.5;(6) 酪素天冬酰胺培养基: 酪氨酸0.2 g,天冬酰胺0.5 g,酵母提取物1 g,葡萄糖0.5 g,磷酸氢二钾1 g,硫酸镁1 g,琼脂粉17 g,水1000 mL,pH 7.5;(7) 高氏一号培养基: 可溶性淀粉

20 g,硝酸钾0.1 g,磷酸氢二钾0.05 g,硫酸镁0.05 g,硫酸亚铁0.001 g,琼脂粉17 g,水1000 mL,pH 7.5;(8) ISP2 培养基<sup>[10]</sup>;(9) ISP3 培养基<sup>[11]</sup>。

以上培养基中加入重铬酸钾、放线菌酮、萘啶酮酸和制霉菌素以抑制细菌和霉菌的生长<sup>[12]</sup>,不同盐度的培养基加入不同剂量的抑菌剂(表1)。每升培养基中加入微量盐: 硫酸亚铁、硫酸锌和氯化锰各1 mg,加入维生素 VB<sub>1</sub> 0.5 mg,VB<sub>2</sub> 0.5 mg,VB<sub>6</sub> 0.05 mg,VE 1 mg,VC 5 mg。

表1 培养基中加入抑菌物质的量

Table 1 The contents of bacteriostatics in the culture medium

Salt contents/%	Potassium dichromate/(mg/L)	Nalidixic acid/(mg/L)	Nystatin/(mg/L)	Actidione/(mg/L)
25	25	10	10	5
20	25	10	10	5
15	25	10	10	5
10	50	20	20	10
5.0	50	20	20	10
1.5	50	30	30	10

分离到的放线菌经纯化培养,16S rRNA 基因测序,BLAST 比对序列鉴定到属。

## 2 结果

### 2.1 沉积物样品组分的测定

测定样品可溶性总盐,表层样品(0-30 cm)总盐平均含量为17.58%,中间层样品(30-60 cm)总盐平均含量为2.63%,深层样品(60-90 cm)总盐平均含量为1.02%。可以认为在0-90 cm范围内,表层水分易蒸发,因而表层盐度要高于深层盐度。测定样品中几种主要离子成分的摩尔比例,钠离子:氯离子:硫酸根离子:镁离子:钙离子:钾离子=17.0:13.4:1.8:0.9:0.7:0.1,可知钠离子和氯离子是样品的主要盐离子成分,其次为硫酸根离子,推断该盐湖盐成分以氯化钠为主。

根据取样深度和样品含盐量的测定结果,将16个样品混合成3份,分别用A、B、C表示,A样品为0-30 cm深度样品,包括A1006,A1012,A1013,A1018,A1019,A1020六个样品;B样品为30-60 cm深度样品,包括A1010,A1011,A1015,A1017,A1021;C样品为60-90 cm深度样品,包括A1007,A1009,A1016。

### 2.2 免培养方法分析艾丁湖沉积物放线菌多样性

#### 2.2.1 沉积物总DNA提取及放线菌特异性序列的

扩增:琼脂糖凝胶电泳检测样品A、B、C总DNA的提取量(图1),结果深层的C样品有较亮的条带出现,中间层的B样品有较弱的条带出现,而浅层的A样品没有条带出现。原因可能是C样品位于沉积物底层,含盐量低,温度、含水量较为恒定,生存于其中的微生物数量较多;A样品位于沉积物表层,盐度高,温度和含水量变化幅度大,不利于微生物的生存繁殖,因而提取的DNA量少,电泳检测时没有条带显现。

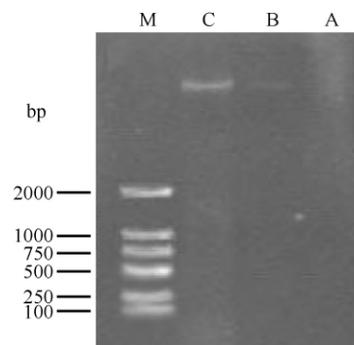


图1 样品总DNA电泳检测结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total DNA from sediment samples. M: DNA marker DL2000; A, B and C: genomic DNAs of sediment samples A, B and C, respectively.

3个样品总DNA用放线菌特异性引物(S-20,A-19)进行扩增,在640 bp处有条带(图2)。A样品和B样品虽然总DNA量较少,但是PCR能扩增

出放线菌特异性片段。在 PCR 反应体系中需加入 BSA( Bull Serum Albumin 牛血清蛋白) 保护 *Taq* 酶的活性。反应循环次数为 30 时只能得到较暗的条带, 调整为 35 次才能获得较亮的条带。

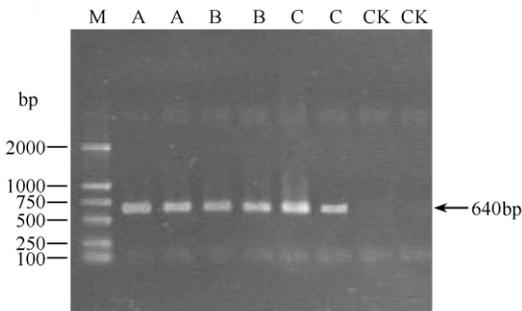


图 2 放线菌特异性序列扩增电泳检测结果

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR amplified DNA using Actinobacteria-specific primers S-20 and A-19. M: DNA marker DL2000; A-C: Partial 16S rDNA amplicons of samples A-C. CK: Blank control.

**2.2.2 克隆文库的构建:** 纯化后的 PCR 产物通过 T4 DNA 连接酶与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。蓝白斑筛选, A 样品得到 195 个白色克隆, B 样品得到 202 个白色克隆, C 样品得到 168 个白色克隆。应用 M13 引物进行菌落 PCR, 扩增克隆子的插入序列, 排除假阳性克隆。A 样品共得到 84 个阳性克隆, B 样品得到 80 个阳性克隆, C 样品得到 134 个阳性克隆。

**2.2.3 克隆文库的检验及样品放线菌多样性指数分析:** 用 *Hae* III 酶切菌落 PCR 产物, 琼脂糖凝胶电泳, 得到酶切图谱(图 3)。通过比较酶切图谱, 3 个

文库共挑选 298 个阳性克隆中的 63 个克隆送上海生工测序。测序结果经过序列比对, 去除非放线菌序列, 得到 273 个放线菌克隆, 分别归于 33 个 OTU, 序列 GenBank 注册号为 HQ718731-HQ718762。

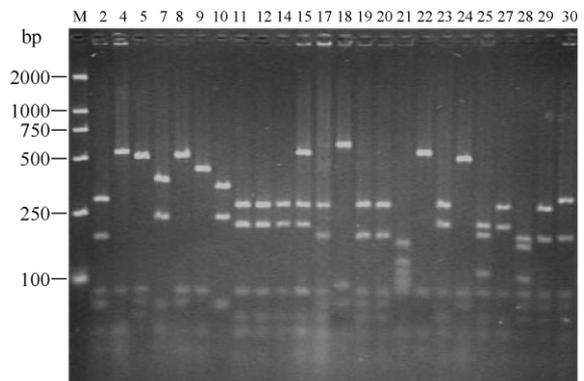


图 3 克隆子插入片段的 *Hae* III 酶切电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of insert segment of clones digest by *Hae* III. M: DNA marker DL2000; 2-30: Number of clones.

使用软件 SPADE 进行放线菌多样性指数分析(表 2)。表层样品 A、中层样品 B 和深层样品 C 的物种丰富度(Species Richness)分别为 18.9, 31.2, 23.1; 香农指数(Shanno Index)分别为 2.09, 2.939, 1.805; 辛普森指数(Simpson Index)分别为 0.2693, 0.0792, 0.2689。由结果可以得出, 中间层样品的物种最为丰富, 深层样品次之, 表层样品物种最少。香农指数和辛普森指数也显示出中间层样品的放线菌物种多样性最高。

表 2 3 个不同深度样品中放线菌多样性指数比较

Table 2 Comparison of actinobacterial diversity index of three samples with different depth

Sample	No. of OTUs	Species Richness		Shanno Index		Simpson Index	
		ACE-1	95% CIs	Chao&Shen	95% CIs	MLE	95% CIs
A	15	18.9	(15.7, 36.8)	2.090	(1.566, 2.613)	0.2693	(0.1731, 0.3656)
B	21	31.8	(23.6, 65.2)	2.939	(2.692, 3.187)	0.0792	(0.0569, 0.1015)
C	13	23.1	(23.1, 72.4)	1.805	(1.367, 2.242)	0.2689	(0.0940, 0.4438)

用稀有度统计方法分析 3 个文库中 273 个克隆的多样性, 从 Rarefaction curve 图(图 4)可以看出文库 A 和 C 曲线已接近平台期, 库容(Library size)已经足够, 涵盖了该样点的绝大多数物种。文库 B 没有达到饱和, 挑选的克隆数量不足以获得完整的多样性信息。

**2.2.4 基于免培养的艾丁湖放线菌多样性分析:** 33 个 OTU 序列同 GenBank 数据库中已知序列进行比对, 共同构建系统发育树(图 5)。从系统发育树可以看出这些序列代表的菌株分布在放线菌纲中的 3 个亚纲: 放线菌亚纲, 酸杆菌亚纲和红色杆菌亚纲。放线菌亚纲中的 208 个克隆分布于 7 个亚目, 占到

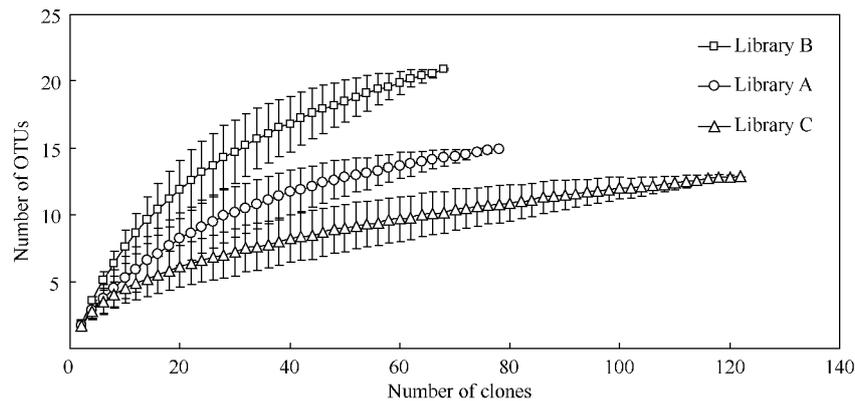


图4 艾丁湖样品放线菌稀有度曲线

Fig. 4 Rarefaction curve for Aiding lake sediment sample.

了总克隆数的 76.2%。其中罗斯氏菌属占到克隆总数的 37% ,是该环境放线菌的优势菌。假诺卡氏菌亚目 ( Pseudonocarineae )、放线多孢菌亚目 ( Actinopolysporineae ) 和链霉菌亚目 ( Streptomycineae ) 分别占到了总克隆数的 12.82%、9.52% 和 9.16% ,属于中等数量类群。棒杆菌亚目 ( Corynebacterineae )、丙酸杆菌亚目 ( Propionibacterineae ) 和弗兰克氏菌亚目 ( Frankineae ) 克隆数较少 ,属于稀有类群。红色杆菌亚纲中有 52 个克隆 ,占总克隆数的 19.05% ,这些序列与 GenBank 中已知的红色杆菌序列相似度较低 ,可能是新的放线菌类群。酸微菌亚纲 13 个克隆 ,占总克隆数 4.76% ,与 GenBank 中已知的微球菌序列最大相似度小于 92% ,也可能是酸微菌亚纲中新的类群。

表层样品分布有 5 个放线菌属 ,中间层样品分布有 9 个放线菌属 ,深层样品分布有 12 个放线菌属。可以看出 ,在 0 - 90 cm 范围内 ,深层样品的放线菌类群多样性高于浅层样品。罗斯氏菌属在 3 个层次样品中有广泛的分布 ,在深层数量最多 ,在中层和表层数量相对较少。

红色杆菌亚纲中的克隆在浅层分布广泛 ,在深层数量很少 ,这与罗斯氏菌的分布相反。与红色杆菌亚纲中的克隆序列最相近的嗜热油菌属 ( *Thermoleophilum* ) 为专性嗜热菌<sup>[13]</sup> ,而吐鲁番盆地夏季地表温度可达 80℃ ,有高温放线菌存在的条件 ,因此可以推断在这一地区存在一定种类和数量的耐高温放线菌。

### 2.3 艾丁湖沉积物可培养放线菌的多样性

通过分离培养 ,共得到 55 株放线菌 ,分布在放线菌目的 6 个亚目中。链霉菌亚目中链霉菌属 24 株 ,占到分离菌株总数的 43.6% ,是分离培养得到最多的类群。链孢囊菌亚目 ( Streptosorangineae ) 中拟诺卡氏菌属 13 株 ,是中等数量的类群。假诺卡氏菌亚目中分离菌株的多样性较高 ,有糖多孢菌属 ( *Saccharopolyspora* ) 4 株 ,假诺卡氏菌属 ( *Pseudonocardia* ) 4 株 ,异壁链霉菌属 ( *Streptoalloteichus* ) 1 株 ,糖单孢菌属 ( *Saccharomonospora* ) 1 株 ,拟无枝菌酸菌属 ( *Amycolatopsis* ) 1 株。微球菌亚目 ( Micrococccineae ) 中有微球菌属 ( *Micrococcus* ) 1 株 ,栖白蚁菌属 ( *Isoptericola* ) 1 株 ,产丝菌属 ( *Myceligenans* ) 1 株。小单孢菌亚目 ( Micromonosporineae ) 中疣孢菌属 ( *Verrucosipora* ) 2 株。放线多孢菌亚目 ( Actinopolysporineae ) 中放线多孢菌属 ( *Actinopolyspora* ) 2 株。

不同深度的沉积物样品分离到的放线菌种类有一定的差异 ( 见表 3 )。在 3 个层次样品中均分离到较多的链霉菌和拟诺卡氏菌 ,其中深层样品分离到的链霉菌最多 ,中间层样品分离到的拟诺卡氏菌最多。除了链霉菌和拟诺卡氏菌这两个主要类群外 ,表层和中间层样品分离到了假诺卡氏菌亚目中的 10 株放线菌 ,分属于糖多孢菌属、假诺卡氏菌属、异壁链霉菌属、糖单孢菌属和拟无枝菌酸菌属 ,而深层样品中只分离到假诺卡氏菌亚目中 1 株糖多孢菌。深层样品中分离到了微球菌亚目中的 3 株放线菌 ,而在浅层样品和中间层样品中没有分离到微球菌亚目的放线菌。

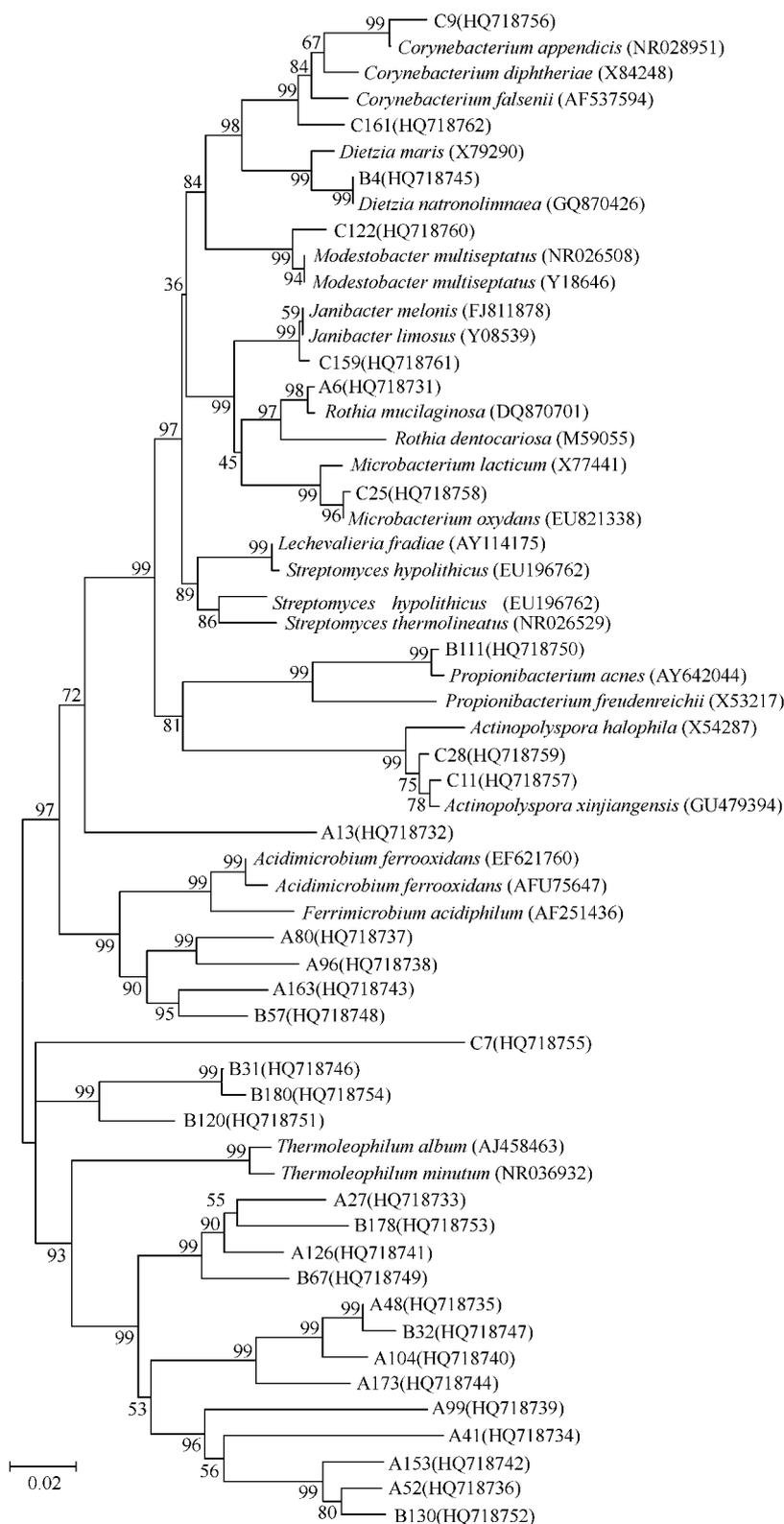


图5 艾丁湖沉积物样品部分克隆序列与放线菌相关种构建的以16S rRNA基因为基础的系统发育树

Fig.5 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among acinobacterial 16S rRNA gene partial sequences obtained from the sediment samples of Aiding lake and their closely related sequences downloaded from GenBank.

表3 不同深度沉积物样品中放线菌的分布

Table 3 Distribution of actinomycetes from sediment of different depth

Species	Sample A	Sample B	Sample C
<i>Streptomyces</i>	7	7	10
<i>Nocardioopsis</i>	3	6	4
<i>Saccharopolyspora</i>	3	-	1
<i>Pseudonocardia</i>	-	4	-
<i>Saccharomonospora</i>	1	-	-
<i>Streptoalloteichus</i>	1	-	-
<i>Amycolatopsis</i>	-	1	-
<i>Micrococcus</i>	-	-	1
<i>Isoptericola</i>	-	-	1
<i>Myceligenans</i>	-	-	1
<i>Verrucosipora</i>	-	1	1
<i>Actinopolyspora</i>	1	1	-

不同盐浓度的培养基分离到的放线菌种类有明显差异(表4)。1.5%和5%盐浓度的培养基分离到的链霉菌种类最多,5%和10%盐浓度的培养基上分离到的较多数量的拟诺卡氏菌,在20%盐浓度的培养基上分离到了糖多孢菌和假诺卡氏菌。上述分离结果与放线菌的盐浓度分离效应相一致<sup>[10]</sup>。利用盐浓度为5%的培养基分离到的放线菌种类最多,其次为10%盐浓度的培养基。

表4 不同盐浓度培养基分离到的放线菌种类

Table 4 Actinomycetes isolated from culture medium with different salt contents

Species	Salt Content					
	1.5%	5%	10%	15%	20%	25%
<i>Streptomyces</i>	8	15	1	-	-	-
<i>Nocardioopsis</i>	1	6	5	1	-	-
<i>Saccharopolyspora</i>	1	-	-	-	3	-
<i>Pseudonocardia</i>	-	-	3	-	1	-
<i>Saccharomonospora</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Streptoalloteichus</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Amycolatopsis</i>	-	-	1	-	-	-
<i>Micrococcus</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Isoptericola</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Myceligenans</i>	-	1	-	-	-	-
<i>Verrucosipora</i>	1	1	-	-	-	-
<i>Actinopolyspora</i>	-	-	1	1	-	-

不同的培养基在分离该环境样品时分离到的放线菌种类和数量有差异。其中壳聚糖天冬酰胺培养基分离到的放线菌最多,分布在链霉菌属、拟诺卡氏菌属、糖多孢菌属和拟无枝菌酸菌属共16株放线菌。高氏一号分离到的多为链霉菌属,甘油精氨酸分离到的多为拟诺卡氏菌。营养物质比较丰富的

ISP2培养基只分离到2株放线菌,可能高营养的培养基不适合分离低营养环境中的放线菌。分离到的放线菌有6株的16S rRNA基因序列(HQ229000, HQ286045, HQ873624, HQ873631, HQ873632, HQ873636)与已有效发表菌株的序列相似性小于97%,为潜在的放线菌新分类单元。

与免培养相比,分离培养得到的放线菌多样性偏低。分离培养得到的链霉菌和拟诺卡氏菌占有较大比例,而免培养中占优势的罗斯氏菌属和红色杆菌亚目中的嗜热菌却没有分离到,需要进一步改进分离培养条件。

### 3 讨论

免培养和分离培养得到的放线菌多样性有差异,是因为这2种方法各有自身的优势和不足。基于DNA信息的免培养技术能够快速调查分析环境中微生物的多样性,不足之处在于环境DNA提取和PCR都可能具有偏向性,且不能得到菌株实物;分离培养能获得纯培养菌株,但是环境样品中多数菌株还不能用现有分离培养的方法得到。因此必须将免培养和分离培养结合起来才能够更全面分析环境样品的微生物多样性。

艾丁湖沉积物深层样品和浅层样品的放线菌多样性有较大区别,深层样品放线菌种类和数量要多于浅层样品。浅层样品含盐量高,温度变化幅度大,一般的放线菌不易存活,造成浅层放线菌多样性较低。深层样品含盐量较低,温度相对恒定,因而放线菌多样性要高于浅层样品。浅层样品中分布着一定数量的耐高温放线菌,而深层样品中只有极少的耐高温放线菌,这符合自然选择规律。

有学者用相同的免培养方法对云南江城、黑井盐矿<sup>[14]</sup>和新疆硝尔库勒盐湖<sup>[15]</sup>、于田盐池<sup>[16]</sup>进行了放线菌多样性分析,发现放线菌亚纲是盐环境放线菌的主要类群,在酸微菌亚纲也有少量分布。在本研究中,艾丁湖放线菌也是大多分布在放线菌亚纲中,少数分布在酸微菌亚纲中,与上述几个盐环境的研究结果相一致。但是在本研究中发现艾丁湖放线菌在红色杆菌亚纲中也有分布,属于耐高温放线

菌类群,可能与该地区独特的夏季高温气候相关。可以提高培养温度,尝试从样品中分离耐高温放线菌。

9种培养基中分离到放线菌最多的一种培养基是壳聚糖天冬酰胺培养基,该培养基中添加了壳聚糖,可能是该成分促进了放线菌的生长。分析原因可能是湖底沉积物存在一些甲壳动物的残留物,在环境营养相对贫乏的时候,微生物利用甲壳素作为能量来源,长期进化,形成了能利用甲壳素的机制。

综合免培养和分离培养得到的放线菌多样性结果,艾丁湖沉积物蕴藏着独特的放线菌资源,并检测到多种稀有耐盐放线菌和耐高温放线菌,有进一步研究的价值。

## 参考文献

- [1] Newman DK, Banfield JF. How molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. *Science*, 2002, 296(5570): 1071-1077.
- [2] Takahashi Y, Omura S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2003, 49(3): 141-154.
- [3] 郑喜玉,张明刚,徐旭,李秉孝. 中国盐湖志. 北京: 科学出版社, 2002.
- [4] 鲍士旦. 土壤农化分析. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [5] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [6] Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10): 828-841.
- [7] Jiang HC, Dong HL, Zhang GX, Yu BS, Chapman LR, Fields MW. Microbial Diversity and Sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwest China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3832-3845.
- [8] 图雅,朱伟云,陆承平. 东北虎粪细菌区系的 16S rRNA 基因序列分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(5): 671-674.
- [9] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6189-6200.
- [10] 唐蜀昆,姜怡,职晓阳,娄凯,李文均,徐丽华. 嗜盐放线菌分离方法. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2007, 34(2): 390-392.
- [11] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of streptomyces species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16(3): 313-340.
- [12] 安德荣,慕小倩,赵文军,刘翠娟,史遂校. 土壤放线菌分离中抑制剂的应用研究. *西北农业学报 (Acta Agriculturae Boreali - occidentalis Sinica)*, 2002, 11(1): 106-108.
- [13] Yakimov MM, Lunsdorf H, Golyshin PN. *Thermoleophilum album* and *Thermoleophilum minutum* are culturable representatives of group 2 of the *Rubrobacteridae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(2): 377-380.
- [14] 吴晋元,职晓阳,李岩,关统伟,唐蜀昆,徐丽华,李文均. 云南江城和黑井盐矿沉积物未培养放线菌多样性比较. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2008, 35(10): 1550-1555.
- [15] 关统伟,吴晋元,职晓阳,唐蜀昆,徐丽华,李文均,张利莉. 硝尔库勒湖沉积物中非培养放线菌多样性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48(7): 851-856.
- [16] 关统伟,赵珂,夏占峰,孙红专,张利莉. 新疆于田盐池放线菌群落结构. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2009, 36(4): 515-521.

# Studies on the Actinobacterial Diversity in Aiding Lake Sediments

Zhanfeng Xia<sup>1,3</sup>, Tongwei Guan<sup>1,3</sup>, Jisheng Ruan<sup>2</sup>, Ying Huang<sup>2\*</sup>, Lili Zhang<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps; Tarim University, Alar 843300, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>3</sup> College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China

**Abstract:** [Objective] This study aims at investigating the diversity of actinobacteria in Aiding Lake, a hypersaline lake and the lowest land point in China. [Methods] The diversity of actinobacteria in the sediment from Aiding Lake was investigated by culture-independent method based on phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences and selective isolation. Specific primers were used to amplify the actinobacterial 16S rRNA gene, and corresponding clone libraries were constructed for the sediment samples. Different clones selected on the basis of *Hae* III digestion patterns were sequenced. Nine selective media with different salinities were used to isolate actinobacteria from the sediment samples. [Results] The analysis of 16S rRNA gene sequences showed that 273 clone sequences belonged to subclasses Actinobacteridae (208), Acidimicrobidae (13) and Rubrobacteridae (52). The dominant actinobacteria was genus *Rothia*, which accounted for 37% of total clones. The similarity between 45.8% of 273 detected sequences and published sequences were less than 97%, which might represent new taxa. Some sequences, which formed several distinct clades in phylogenetic tree may represent new taxonomical groups of actinobacteria. Fifty-five strains were isolated by different selective media. They belonged to six suborders of the order Actinomycetales, of which *Streptomyces* and *Nocardiopsis* were the dominant groups. Six potential new species were obtained. [Conclusion] Aiding Lake harbors abundant actinobacteria, including large number of unknown actinobacterial groups.

**Keywords:** aiding lake, actinobacterial diversity, cultural-independent method, selective isolation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Special Prophase Project on Basic Research of the National Department of Science and Technology (2010CB134505), by the Key Project for Department of Science and Technology of Ministry of Education of China (209145), by the Opening Project by State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences (SKLMR-20090603) and by the National Natural Science Foundation of China (1060003)

\* Corresponding author. Tel: +86-40-64807311; Fax: +86-40-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn (Ying Huang); Tel: +86-997-4681612; Fax: +86-997-4681612; E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn (Lili Zhang)

Received: 1 February 2011 / Revised: 3 April 2011