

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
52(7):816-824; 4 July 2012  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 孟加拉虎粪便放线菌的分离及其多样性

曹艳茹<sup>1,2</sup>, 姜怡<sup>2\*</sup>, 李有龙<sup>3</sup>, 陈秀<sup>2</sup>, 靳荣线<sup>2</sup>, 和文祥<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>西北农林科技大学资源环境学院, 杨凌 712100;

<sup>2</sup>云南大学微生物研究所, 西南微生物多样性教育部重点实验室, 昆明 650091;

<sup>3</sup>云南野生动物园, 昆明 650091

**摘要:**【目的】建立有效分离动物粪便放线菌的方法, 认识孟加拉虎粪便放线菌的多样性。【方法】从预处理、抑制剂、培养基三个方面考虑, 采用平板稀释的分离方法。用细菌通用引物扩增获得放线菌菌株的 16S rRNA 基因, 根据系统发育分析进行鉴定。【结果】孟加拉虎粪便样品中, 可培养放线菌的菌落平均数量为  $1.10 \times 10^8$  cfu/g (粪便湿重); 对分离到的 110 株纯培养放线菌的 16S rRNA 基因部分序列分析表明: 它们分布于 10 个科、12 个属, 主要是一些菌丝分化程度低的放线菌, 如: *Arthrobacter*、*Dietzia*、*Kocuria*、*Corynebacterium*、*Microbacterium* 等; 产丝的放线菌主要以 *Streptomyces* 占优势, 约占分离到放线菌总数的 64%。【结论】干热处理粪便样品可以大大提高放线菌的出菌率; 添加多种抑制剂及不含天然成分的组合培养基较适合粪便放线菌的分离; 孟加拉虎粪便中可培养放线菌的多样性较丰富。本研究提供的分离动物粪便放线菌的有效方法, 为动物粪便放线菌资源的研究和开发利用提供了借鉴作用。

**关键词:** 孟加拉虎, 粪便放线菌, 分离方法, 16S rRNA 基因, 多样性

**中图分类号:** Q939   **文献标识码:** A   **文章编号:** 0001-6209 (2012) 07-0816-09

地球上的动物种类高达 150 多万种, 它们的生境千差万别, 从陆地上的高山、森林、草地、沙漠, 到海洋、河流和湖泊等随处可见他们的身影。这些丰富多样的动物, 体内蕴藏着数量巨大、种类各异的微生物<sup>[1-2]</sup>, 该微生物区系基因组包含的基因数量大约是宿主本身基因数量的 100 倍<sup>[3]</sup>。在大多数哺乳动物中, 肠道微生物主要的优势类群是: 厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria) 和变形菌门 (Proteobacteria)<sup>[1]</sup>。可见, 动物肠道放线菌是一类数量庞大、不容忽视的重

要资源。

放线菌由它的代谢产物丰富而出名, 它产生的抗生素、氨基酸、酶制剂、有机酸等在工业、农业、医药等领域上产生了巨大的经济效益。自 1941 年, 链霉素——第一个用于临床的抗生素发现以来, 卡那霉素、庆大霉素、庆大霉素等相继问世, 放线菌已悄然担负起了挖掘新药物的重担。迄今为止, 微生物产生的 2 万多种生物活性物质 45% 以上是放线菌产生的<sup>[4]</sup>。近年, 由于致病菌耐药性的不断增强以及一些新疾病的出现, 使得新药研发更加亟不可待。

**基金项目:** 国家自然科学基金 (30900002 和 21062028); 国家重大专项 (2009ZX09302-003); 美国 NIH 项目 (1P41GM086184-01A1)

\* 通信作者。姜怡, Tel: +86-871-5034073, Fax: +86-871-5173878, E-mail: jiangyikm@hotmail.com; 和文祥, Tel: +86-29-87081624, Fax: +86-29-8708055, E-mail: wxhe1968@163.com

**作者简介:** 曹艳茹 (1983-), 女, 内蒙古人, 博士研究生, 主要从事放线菌资源研究。E-mail: yanrucao3@yahoo.com.cn

**收稿日期:** 2012-02-16; **修回日期:** 2012-04-18

然而,重复菌株的重复发现严重阻碍了新药的研发进度。为此,英国科学家 Goodfellow<sup>[5]</sup> 等提出,在筛选具有新结构药物时,新的筛选过程和来自新生境的新菌株是加快这一过程的重要手段。肠道放线菌就是这样一类相对未开发的新资源,目前已有学者开始关注<sup>[6]</sup>,它很有可能是新物种和新基因的丰富资源,而新基因和新物种通常又意味着产生新的天然产物<sup>[7]</sup>。要从动物粪便获得新的放线菌,好的选择性分离方法是前提之一;过去很多工作表明,革兰氏阴性细菌和其他非放线菌革兰氏阳性细菌占的比重很大;为了抑制它们,同时又使放线菌尽可能生长并非易事;同分离土壤、海洋和其它环境放线菌相比,分离肠道放线菌难度大得多。

目前对于肠道微生物的研究工作很多是以粪便作为研究对象而进行的。如 Arumugam 等<sup>[8]</sup> 在研究人类肠道微生物的类群时就是从粪便中提取微生物的宏基因组而进行的;Zhu 等<sup>[9]</sup> 以大熊猫粪便作为研究材料,对其肠道微生物进行研究,从而找到了大熊猫能够代谢纤维素的证据;Ley 等<sup>[10]</sup> 在研究哺乳动物的进化和其肠道微生物时也是以动物粪便作为研究对象的。粪便样品的采集是一种非侵入性、方便的方法,而且基本上包括了肠道中所有的微生物种类<sup>[11-12]</sup>,是研究肠道微生物多样性比较好的样本。因此,本研究就以云南野生动物园孟加拉虎 (*Panthera tigris tigris*) 作为研究对象,探究了动物粪便放线菌的分离方法,初步获得孟加拉虎粪便可培养放线菌的群落结构和多样性,力求为放线菌源的新药开发提供更广阔有用的研究材料。获得的纯培养菌株,也为研究它们在动物肠道中的作用提供了物质基础;同时也为我国一级重点保护野生动物孟加拉虎的健康参考提供一些数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 研究动物概况:**孟加拉虎 (*Panthera tigris tigris*) 又名印度虎,是目前数量最多、分布最广的虎的亚种,属脊索动物门、哺乳纲、食肉目、猫科、豹属。孟加拉虎主要生活在孟加拉和印度,在尼泊尔、不丹和中国也有少量分布。它的栖息地较广,主要活动于树林和草原。孟加拉虎喜欢在夜间捕食,以各种鹿、羚和牛等作为主食,是我国的一级重点保护野生

动物。

**1.1.2 样品采集:**粪便样品采自云南昆明野生动物园的3只健康成年的孟加拉虎,采样时间为2009年4月。采样时,在其排便后,立即用无菌镊子将粪便中间部分放入无菌袋中并置于冰盒中,带回实验室4℃保存,以备分离。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**溶菌酶、蛋白酶、*Taq* 酶购自 TaKaRa 公司;PCR 仪购自德国 Biometra 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司,其余试剂为国产分析纯试剂。

**1.1.4 引物:**采用细菌通用引物 Primer A: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (与 16S rRNA 基因 5' 端 8 - 27 位点碱基相同); Primer B: 5'-TTAAGGTGATCCAGCCGCA-3' (与 16S rRNA 基因 3' 端 1523 - 1504 位点碱基相同),该引物由 TaKaRa 公司合成。

### 1.2 粪便放线菌的分离

动物粪便样品具有含水量高、大肠杆菌及其他一些革兰氏阴性菌较多等特殊性质,使得粪便放线菌的分离更加艰难。为此,我们设计了以下分离方案。

**1.2.1 样品预处理:**将3只健康成年孟加拉虎的三份粪便样品(A、B、C)分别称取2份(1g/份)。一份置于4℃待用(A1、B1、C1);另一份置于无菌培养皿中室温干燥(A2、B2、C2)后于80℃处理1h。然后将6份样品分别混匀稀释至 $10^6$ 倍。

使用分离放线菌效果较好且常用的改良甘油-门冬酰胺培养基(Medium 1, M1):酵母膏 2.5 g,甘油 5 g,门冬酰胺 0.5 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g,  $CaCO_3$  0.3 g, 维生素混合物<sup>[13]</sup> 3.7 mg,琼脂 15 g, pH 7.7, 重铬酸钾 50 mg/L、制霉菌素 100 mg/L。将6份稀释好的样品分别取 0.1 mL 涂布分离平板,于 28℃ 倒置恒温培养 7 d。

**1.2.2 添加不同的抑制剂:**用上述改良甘油-门冬酰胺培养基(Medium 1, M1),抑制剂分两组,其中,一组(Y1)加重铬酸钾 50 mg/L、制霉菌素 100 mg/L;另一组(Y2)在加重铬酸钾 50 mg/L、制霉菌素 100 mg/L 的基础上,再添加抑制革兰氏阴性菌的萘啶酸(40 mg/L)及抑制革兰氏阳性球菌如克雷白杆菌和金黄色葡萄球菌的卡那霉素(5 mg/L)。采用干热处理的样品 A2、B2 和 C2,分别混匀稀释至 $10^6$ 倍,取稀释好样品 0.1 mL 涂布平板,于 28℃ 倒置恒温培养 7 d。

**1.2.3 分离培养基对比试验:**采用干热处理的样品 A2、B2 和 C2, 分别混匀稀释至  $10^6$  倍。使用以下几种半组合 (M1、M2)、组合培养基 (M3、M4)。Medium 1 (M1): 同上, 抑制剂同 Y2。Medium 2 (M2): 蛋白胨 2.5 g, 牛肉膏 1.3 g, 葡萄糖 0.3 g, 可溶性淀粉 2.5 g, 硫代硫酸钠 0.15 g,  $K_2HPO_4$  1.25 g, NaCl 1.5 g, 维生素混合物<sup>[13]</sup> 3.7 mg, 琼脂 15 g, pH 7.2, 抑制剂同 Y2。Medium 3 (M3) HV 培养基: 腐殖酸 1.0 g,  $Na_2HPO_4$  0.5 g, KCl 1.7 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 g,  $CaCl_2$  1 g, 维生素混合物<sup>[13]</sup> 3.7 mg, 琼脂 15 g, pH 7.2, 抑制剂同 Y2。Medium 4 (M4) 海藻糖-脯氨酸培养基: 海藻糖 5 g, 脯氨酸 1 g,  $(NH_4)_2SO_4$  1 g, NaCl 1 g,  $CaCl_2$  2 g,  $K_2HPO_4$  1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g, 复合维生素<sup>[13]</sup> 3.7 mg, 琼脂 15 g, pH 7.2, 抑制剂同 Y2。分别取上述稀释好样品 0.1 mL 涂布平板, 于 28°C 倒置恒温培养 7 d。以上每个分离平板做 3 个重复, 以下数据为 3 个重复的平均值。

### 1.3 菌种计数、纯化

根据菌落大小、颜色、表面光滑以及是否产色素等特征来计数, 记录菌落数量。挑取不同的菌落接种于 ISP 2<sup>[14]</sup> 斜面上, 28°C 恒温培养 7 d, 4°C 保存。

### 1.4 DNA 提取和 16S rRNA 基因的扩增及测序

样品 DNA 按照 Li 等<sup>[15]</sup> 的方法进行提取。PCR 扩增条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 1 min, 54°C 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 30 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物送生工生物工程(上海)有限

公司测序。

### 1.5 系统发育分析与放线菌类群多样性

16S rRNA 基因测序后, 利用 EzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>)<sup>[16]</sup> 在线比对工具进行有效种的相似性搜索, 确定菌株的属种, 并调出相关放线菌的 16S rRNA 基因序列, 用 Clustal X 2.0 进行序列比对, 后用 Mega 4 软件的 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

## 2 结果和分析

### 2.1 粪便放线菌的分离与计数

样品预处理的统计结果见表 1。由表中我们可以看到: 经过干热处理的样品 (A2-C2) 较未处理的样品 (A1-C1) 的细菌和真菌数量都大大减少, 放线菌则明显增加。经干热处理后, 样品 A2 的细菌菌落数较 A1 的减少了 16.1 倍, 真菌减少到 0, 放线菌菌落数增加了 8.6 倍; 样品 B2 的细菌菌落数较 B1 的减少了 14.6 倍, 真菌消失, 放线菌菌落数增加了 9.9 倍 (近 10 倍); 3 份处理样品的细菌菌落数较未处理的样品平均减少了近 16 倍, 真菌减少 3 倍甚至完全没有, 放线菌菌落数平均增加了近 8 倍。干热处理后, 不但放线菌菌落数极显著增加 ( $P < 0.01$ ), 种类也由未处理的 1 种增加到了 3 种。可见, 在粪便放线菌的分离过程中, 干热处理的过程是必不可少的一步。

表 1 孟加拉虎粪便样品经不同处理后细菌、真菌、放线菌的计数结果

Table 1 Culturable bacteria, fungi and actinobacteria counting in *Panthera tigris tigris* feces samples after different processing

Microbe	Colony numbers / (cfu/g feces)					
	A1	A2	B1	B2	C1	C2
Bacteria	$(3.95 \pm 0.08) \times 10^8$	$(2.45 \pm 0.20) \times 10^7$	$(4.35 \pm 0.40) \times 10^8$	$(2.98 \pm 0.50) \times 10^7$	$(4.09 \pm 0.10) \times 10^8$	$(2.39 \pm 0.01) \times 10^7$
Fungi	$(3.00 \pm 1.00) \times 10^6$	$(0 \pm 0.06) \times 10^6$	$(4.00 \pm 1.00) \times 10^6$	$(0 \pm 0.06) \times 10^6$	$(3.00 \pm 1.00) \times 10^6$	$(1.00 \pm 1.00) \times 10^6$
Actinobacteria	$(1.10 \pm 0.10) \times 10^7$	$(9.50 \pm 0.20) \times 10^7$	$(1.00 \pm 0.20) \times 10^7$	$(9.90 \pm 0.30) \times 10^7$	$(1.90 \pm 0.20) \times 10^7$	$(9.00 \pm 0.30) \times 10^7$

Note: Values are shown as means  $\pm$  standard deviation.

添加不同的抑制剂后, 平板菌落数统计结果见图 1。从图 1 可以看出, 采用第二组 (Y2: 重铬酸钾 50 mg/L、制霉菌素 100 mg/L、萘啶酸 40 mg/L、卡那霉素 5 mg/L) 抑制剂后, A2 样品的细菌由添加第一组抑制剂 (Y1: 重铬酸钾 50 mg/L、制霉菌素 100 mg/L) 平板上的 258 个下降到 51 个, 减少了 5 倍多, 放线菌由 89 个增加到了 132 个; B2 样品中的细菌减少了 4.8 倍, 放线菌由 91 个增加到了 151

个; C2 样品中的细菌减少了 5.3 倍, 放线菌增加了近 2 倍。通过抑制剂的改变, 细菌的数量显著降低 ( $P < 0.01$ ), 放线菌数量显著增加 ( $P < 0.01$ )。由此看出, 抑制剂的调整也可优化粪便放线菌的分离条件。

根据分离培养基对比试验的统计结果 (图 2) 可以看出, 含有天然成分 (酵母膏、蛋白胨和牛肉膏等) 的半组合培养基 M1 和 M2 的细菌菌落数分别

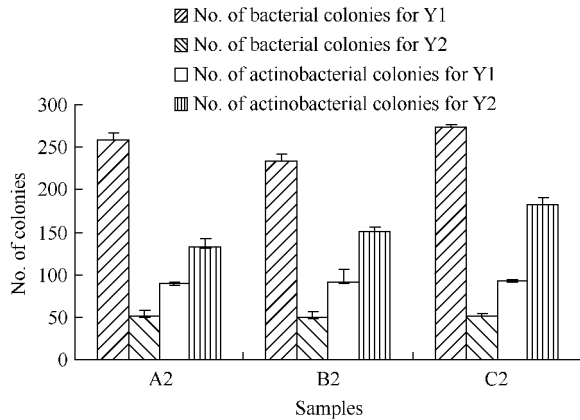


图 1 不同抑制剂处理下的细菌、放线菌的计数结果  
Fig. 1 Culturable bacteria and actinobacteria counting in media with different inhibitors.

为 155 和 375, 远远高于组合培养基 M3 和 M4 的 83 和 96 个。虽然 M2 的放线菌菌落数 125 较 M3 (48) 和 M4 (63) 都高, 但其种类却较单一, M1 有 4 种, M2 仅有 2 种, M3 和 M4 的种类高达 5-6 种。对不含天然成分的组合培养基, 尽管其放线菌数量没有增加, 但其细菌数量却极显著降低 ( $P < 0.01$ ), 这为放线菌数量和种类的增加提供了机会。因此, 在粪便放线菌的分离过程中, 一些天然成分 (酵母膏、牛肉膏等) 的添加还是要慎重。

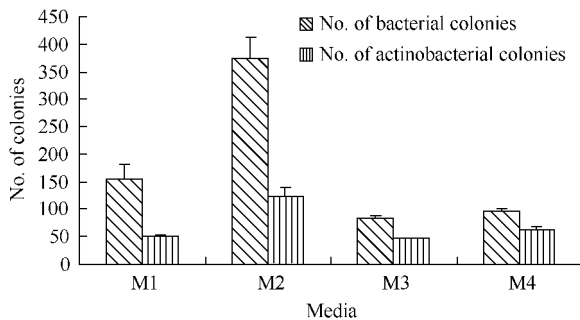


图 2 不同培养基上的细菌、放线菌的计数结果  
Fig. 2 Culturable bacteria and actinobacteria counting in different media.

## 2.2 粪便可培养放线菌的 16S rRNA 基因系统发育分析

此次分离, 共获得孟加拉虎粪便放线菌 110 株。根据形态等特征进行大致归类, 从中挑取 50 株进行 16S rRNA 基因测序, 经 EzTaxon 在线工具比对后, 这些菌株共分属于 10 个科: 链霉菌科 (*Streptomycetaceae*)、微球菌科 (*Micrococcaceae*)、迪茨氏菌科 (*Dietziaceae*)、微杆菌科

(*Microbacteriaceae*)、棒杆菌科 (*Corynebacteriaceae*)、原小单孢菌科 (*Promicromonosporaceae*)、拟诺卡氏菌科 (*Nocardiopsaceae*)、诺卡氏菌科 (*Nocardiaceae*)、假诺卡氏菌科 (*Pseudonocardineae*)、纤维单孢菌科 (*Cellulomonadaceae*)。从图 3 各类群的数量比例可以看出, 链霉菌科的菌株数高达 64%, 占绝对优势; 其次是微球菌科占 7%; 然后是微杆菌科、棒杆菌科、原小单孢菌科各占 5%。在链霉菌科中, 链霉菌属内的物种组成较丰富, 图 4 显示了本次分离的链霉菌属内种的组成情况。其中, 菌株 YIM 100598 与 *Streptomyces albiacialis* NRRL B-24327<sup>T</sup> 的相似性为 98.4%, 与其他有效种的相似性都低于 97%, 该种可能链霉菌属的一个潜在新种, 但还需要杂交等实验的验证。此外, 我们发现了大量 *Streptomyces violaceoruber* 菌株, 这是一类能够产生放线紫红素、次甲霉素、十一烷基灵菌红素等多种活性物质的链霉菌<sup>[17]</sup>; 它产生的榴菌素 (Granaticin), 不但具有抗肿瘤活性, 还能够抑制一些革兰氏阳性细菌的生长<sup>[18]</sup>, 这可能是链霉菌科菌株数最多的原因之一。

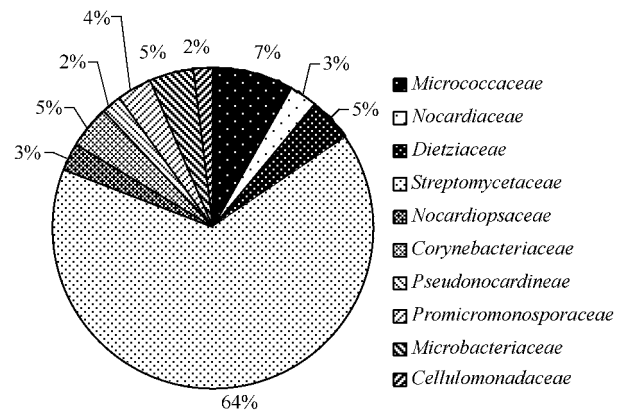


图 3 各放线菌科所占的比例  
Fig. 3 The proportion of different families for Actinomycete.

50 株放线菌共分布于 12 个属, 每个属选取一个代表菌株进行系统发育树的构建。图 5 是其 16S rRNA 基因序列同源性的系统发育分析结果。其中, 菌株 YIM 100602 是新属 *Enteractinococcus* 的一个菌株。我们在华南虎粪便和孟加拉虎粪便中都分离到了该新属菌株<sup>[19]</sup>, 说明这类群的放线菌在虎类粪便中普遍存在。另外, 菌株 YIM 100342 全序列与有效发表菌株 *Nocardia altamirensis* OFN S17<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因序列同源性为 97%, 与标准菌株 *Nocardia pseudobrasiliensis* ATCC 51512<sup>T</sup> 的相似性为 96.5%,

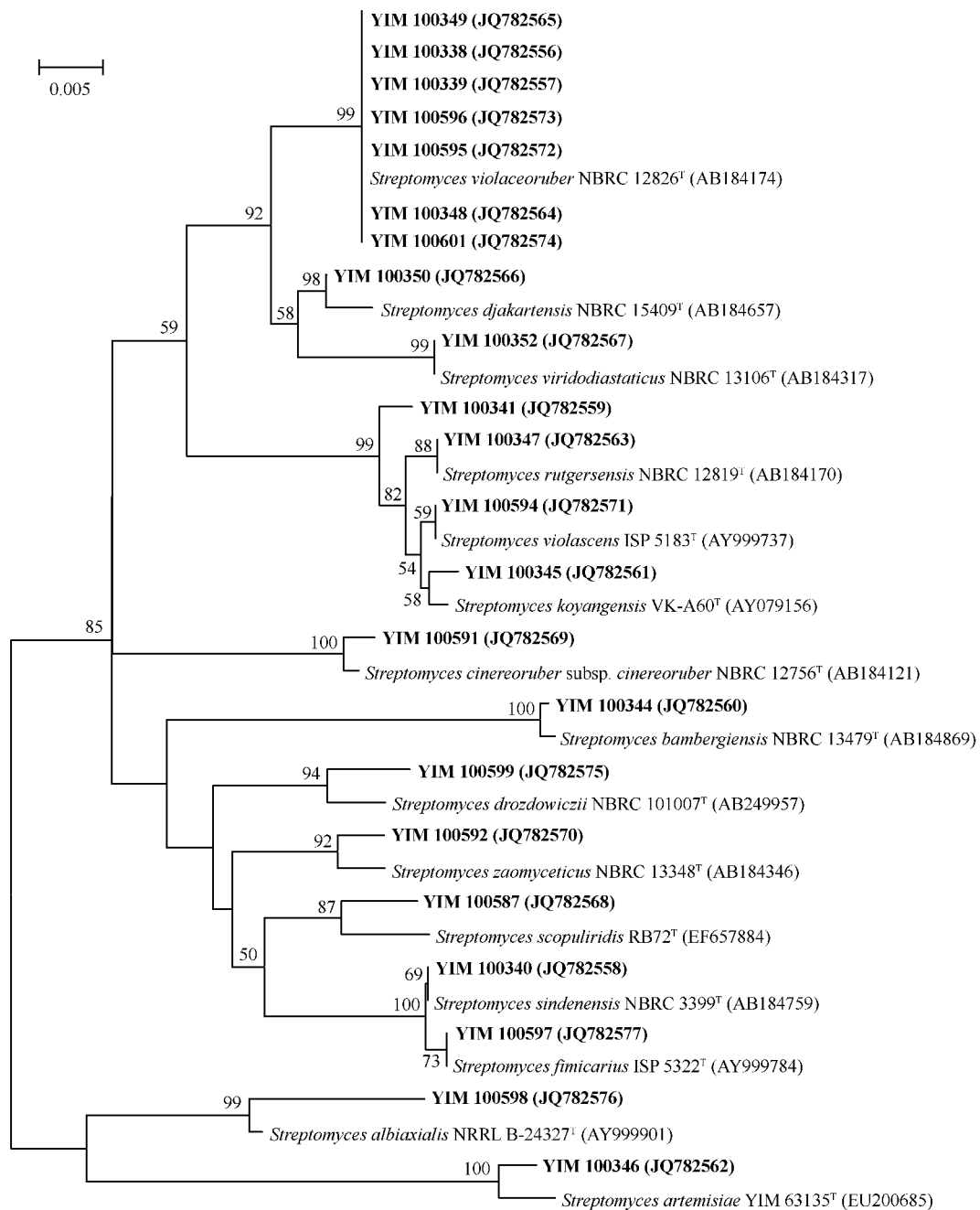


图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建的链霉菌属菌株的系统发育树

Fig. 4 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships based on 16S rRNA gene sequences of culturable strains of *Streptomyces*. Sequences obtained in this work are in bold. Bootstrap values (expressed as percentages of 1,000 replications) greater than 50% are given at the nodes. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position.

与 *Nocardia* 属内其他有效菌株的相似性都低于 96.5%，因此可能为 *Nocardia* 属的一个新种，有关工作会另行发表。在孟加拉虎粪便放线菌中，*Arthrobacter*、*Kocuria*、*Enteractinococcus*、*Dietzia*、*Corynebacterium*、*Promicromonospora*、*Microbacterium*、

*Oerskovia* 等一些简单形态的放线菌的数量较多，在 36% 的非链霉菌中占了 28%，而除链霉菌外的产丝放线菌 (*Nocardia*、*Nocardiopsis*、*Saccharomonospora*) 仅占了 8%。

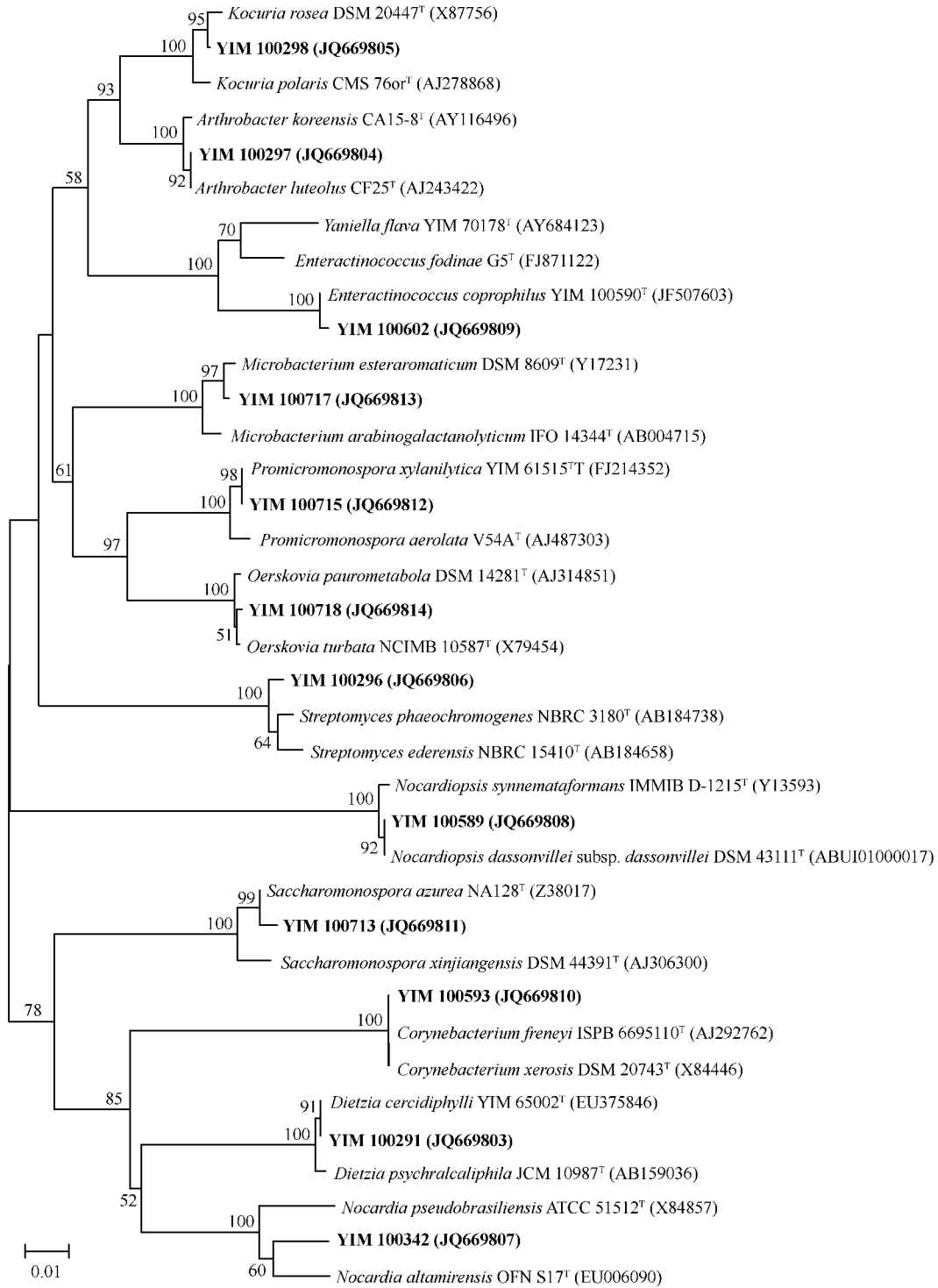


图 5 孟加拉虎粪便可培养放线菌 16S rRNA 基因部分序列构建的系统发育树

Fig. 5 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships based on 16S rRNA gene sequences of culturable Actinobacteria. Sequences obtained in this work are in bold. Bootstrap values (expressed as percentages of 1,000 replications) greater than 50% are given at the nodes. Bar, 1 nt substitution per 100 nt.

### 3 讨论

过去很多人把动物放线菌看作致病菌<sup>[20]</sup>,把动物粪便放线菌作为资源的研究很少,分离方法的研究更是缺乏。与土壤、海洋等环境样品比较,动物粪便存在大量的革兰氏阴性细菌和非放线菌类革兰氏阳性细菌,放线菌占的比例相对较小;此外,很多放线菌的生长周期较长,加剧了分离它的难度。本文以孟加拉虎粪便样品作为研究材料,研究放线菌的分离方法,从样品预处理、抑制剂以及培养基成分等方面进行了探索和研究。我们首先观察经不同处理方式的粪便样品在相同的培养基及培养条件下的生长情况,发现经过干热处理的样品,其细菌和真菌数量减少且放线菌的数量和种类都呈增加趋势。原因主要是细菌、真菌较放线菌耐干和耐热性差,所以随着水分的消失和高温处理,细菌、真菌的数量急剧减少。而大多数放线菌能产孢,既耐干燥又耐高温,因此放线菌数量和种类都大大增加。同时,我们用干热处理过的样品,在相同培养基上添加两组不同抑制剂,观察到:添加了4种抑制剂(重铬酸钾、制霉菌素、萘啶酸和卡那霉素)的放线菌数量,较添加2种的(重铬酸钾和制霉菌素)有所增加(提高近2倍),而细菌的数量降低了5.3倍,这为放线菌数量和种类的增加提供了可能。因为很大一部分放线菌的生长周期较长,如果分离平板没有被细菌和真菌污染,随着培养时间的延长,新的放线菌就有可能“破土而出”。因此可以针对分离放线菌的类群,选择适合的抑制剂。根据本次试验的结果,含天然营养的半组合培养基,其放线菌和细菌的出菌率都高,但放线菌种类却较单一。因此分离粪便放线菌要以组合培养基为主,当然可以试验一些特殊的碳、氮源。根据以上结果,为了分离粪便放线菌:首先,样品需在无菌条件下室温风干(冻干效果较差),然后进行高温处理1h,温度在80-100℃;其次,在分离培养基中添加一些甚至是“高浓度”的抑制剂,如萘啶酸、卡那霉素等,来降低革兰氏阴性菌及非放线菌革兰氏阳性菌的出菌率,加制霉菌素抑制真菌;第三,使用营养成分贫乏或特殊碳、氮源的培养基,其放线菌的出菌率较高且类群比较丰富,因为“贫营养”的环境本身在某种程度上,抑制了细菌的大量生长,给予放线菌充足的空间和营养;第四,不同动

物粪便样品微生物的数量差别很大,找到合适的分离稀释浓度很重要,建议采用稀释 $10^5 - 10^7$ 倍的稀释液。

在分析孟加拉虎粪便放线菌多样性的过程中,我们共获得了10个科、12个属的放线菌。同时,我们发现链霉菌是孟加拉虎粪便的优势放线菌,其比例高达64%,并且 *Streptomyces violaceoruber* 这个类群的数量很大,在所有的分离平板上都占优势。有研究<sup>[17]</sup>报道这类链霉菌能产生多种活性物质,有的能够抑制革兰氏阳性细菌的生长,这可能和它是优势放线菌类群有关,即在某种程度上抑制了其他类群放线菌的生长。本研究仅从孟加拉虎这一种动物的粪便中就获得了多达12个属的放线菌,表明动物肠道中的放线菌资源是十分丰富的。

本研究摸索了分离动物粪便放线菌的有效方法,同时开拓了我们对孟加拉虎肠道放线菌的认识,为孟加拉虎的健康保护提供了理论借鉴;获得的放线菌菌株,是一类来自新生境的微生物资源,它丰富了放线菌药物筛选的资源库。对于地球上丰富的动物种类而言,粪便放线菌资源挖潜利用的潜力巨大。

**致谢** 在采样过程中,云南野生动物园的邱树妹、黄俊龙和白拓等工作给予了热情的帮助,在此表示衷心的感谢!

### 参考文献

- [1] Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 2008, 320: 1647-1651.
- [2] Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 2009, 326: 1694-1697.
- [3] Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich C, Gordon JI. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of The National Academy of Science*, 2004, 101 (44): 15718-15723.
- [4] Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of antibiotics*, 2009, 62: 5-16.

- [5] Goodfellow M, Fiedler HP. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010, 98: 119-142.
- [6] 姜怡, 曹艳茹, 蔡祥凤, 徐丽华, 姜成林. 三种动物粪便及一种虫体可培养放线菌的多样性及其生物活性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(9): 1152-1157.
- [7] Wink J. Actinomycetes taxonomy in the Aventis strain collection. //Kurtboke I, Swings J. *Microbial Genetic Resources and Biodiscovery*. Queensland: Queensland Complete Printing Services, 2004, 249-261.
- [8] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier DE, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, M. de Vos W, Brunak S, Doré J, Consortium M, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011, doi: 10.1038/09944.
- [9] Zhu LF, Wua Q, Dai JY, Zhang SN, Wei FW. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Science Early Edition*, 2011, 1-6. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1017956108.
- [10] Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, Schlegel ML, Tucker TA, Schrenzel MD, Knight R, Gordon JI. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 2008, 320: 1647-1651.
- [11] Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, Lee HK, Shen C, Cojocar G, Shenouda S, Kagnoff M, Eckmann L, Ben-Neriah Y, Raz E. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nature Cell Biology*, 2006, 8: 1327-1336.
- [12] 李永儒, 丁晓贝, 左浩江, 王嵬, 黄玮, 裴晓方. 肠道菌群与粪便性状关系初探. *现代预防医学 (Modern Preventive Medicine)*, 2010, 37(9): 1623-1625.
- [13] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65: 501-509.
- [14] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16: 313-340.
- [15] Li WJ, Xu P, Schumann P, Zhang YQ, Qin Y, Pukall R, Xu LX, Stackebrandt E, Jiang CL. *Georgenia ruanii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China), and emended description of the genus *Georgenia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 1424-1428.
- [16] Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 2259-2261.
- [17] Duangmal K, Ward AC, Goodfellow M. Selective isolation of members of the *Streptomyces violaceoruber* clade from soil. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*, 2005, 245: 321-327.
- [18] Snipes CE, Chang CJ, Floss HG. Biosynthesis of the antibiotic granaticin. *Journal of the American Chemical Society*, 1979, 101(3): 701-706.
- [19] Cao YR, Jiang Y, Jin RX, Han L, He WX, Li YL, Huang XS, Xue QH. *Enteractinococcus coprophilus* gen. nov., sp. nov., of the family *Micrococcaceae* isolated from *Panthera tigris amoyensis* feces, transfer of *Yaniella fodinae* Dhanjal et al. 2011 to the genus *Enteractinococcus* as *Enteractinococcus fodinae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology Papers in Press*. Published January 6, 2012 as doi:10.1099/ijs.0.034249-0.
- [20] Beman BL. Actinomycete pathogen // Goodfellow M, Mordarski M, Williams ST. *The biology of the actinomycetes*. London: Academic press, 1983: 457-480.



# Isolation methods and diversity of culturable fecal actinobacteria associated with *Panthera tigris tigris* in Yunnan Safari Park

Yanru Cao<sup>1, 2</sup>, Yi Jiang<sup>2\*</sup>, Youlong Li<sup>3</sup>, Xiu Chen<sup>2</sup>, Rongxian Jin<sup>2</sup>, Wenxiang He<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling 712100, China;

<sup>2</sup> Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education and Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China;

<sup>3</sup> Yunnan Safari Park, Kunming 650218, China

**Abstract:** [Objective] We studied the isolation methods and diversity of culturable fecal actinobacteria associated with *Panthera tigris tigris* by using culture-dependent approaches. [Methods] Fresh fecal samples of healthy *Panthera tigris tigris* were collected from Yunnan Safari Park. Pretreatment of the samples, isolation media and inhibitors were tested for actinobacteria isolation. 16S rRNA genes of actinobacteria were sequenced and subjected to phylogenetic analysis. [Results] The abundance of culturable actinobacteria was  $1.10 \times 10^8$  cfu/g colony forming units (CFU) per gram of feces (wet weight). We obtained 110 purified cultural actinobacterium strains. The analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that these strains were distributed in 10 different families and 12 genera of actinobacteria at least, and most of them were non-filamentous, such as *Arthrobacter*, *Dietzia*, *Kocuria*, *Corynebacterium* and *Microbacterium*. *Streptomyces* was the mainly classical filamentous actinobacteria, and up to 64% of total. [Conclusion] Drying and heating up the fecal samples can greatly increase the rate of the actinobacteria. Many kinds of inhibitors and chemical defined media are suitable for isolation of fecal actinobacteria. The culturable actinobacteria are abundant in *Panthera tigris tigris* feces. Our study found an effective method to isolate animals' fecal actinobacteria and it's useful for studying and exploiting animals' fecal actinobacteria.

**Keywords:** *Panthera tigris tigris*, fecal actinobacteria, isolation, 16S rRNA gene, diversity

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900002, 21062028), by the National Major Scientific and Technology Special Projects (2009ZX09302-003), and by the National Institutes of Health USA (1P41GM086184-01A1)

\* Corresponding authors. Yi Jiang, Tel: +86-871-5034073, Fax: +86-871-5173878, E-mail: jiangyikm@hotmail.com; Wenxiang He, Tel: +86-29-87081624, Fax: +86-29-8708055, E-mail: wxhe1968@163.com

Received: 16 February 2012 / Revised: 18 April 2012