

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(4): 379–389; 4 April 2013
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

不同被捕食细菌对新疆盐碱地粘细菌分离的影响

李百元^{1 2 3}, 谢小林², 张鲜娇², 蔡卓平², 朱红惠^{2*}

¹中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301

²广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 广州 510070

³中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要 【目的】利用被捕食细菌诱导粘细菌形成子实体的方法分离新疆盐碱地粘细菌, 并初步分析被捕食菌与被诱导粘细菌之间关系。【方法】从盐碱地分离出 16 株对粘细菌具有不同诱导作用的可被捕食细菌, 将其用以分离新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌。【结果】对 25 个盐碱地土样的粘细菌进行分离, 共分离到 55 株粘细菌, 结合分子生物学手段和形态学特征, 初步将其归属为粘球菌属、珊瑚球菌属、*Pyxidicoccus*、孢囊杆菌属和侏囊菌属及 6 株无法纯化的疑似粘细菌。供试的 16 株被捕食细菌诱导粘球菌属均具有较好效果, 而 *Pyxidicoccus* 和孢囊杆菌只能由革兰氏阳性菌诱导。【结论】与传统分离方法比较, 采用多种被捕食细菌分离粘细菌其出菌率明显提高, 数量增加, 且易观察和挑取, 有利于后续纯化。不同粘细菌的捕食菌谱及捕食嗜好不同, 增加被捕食细菌筛选范围可能会提高粘细菌的分离效率。本研究采用被捕食菌分离粘细菌的方法为粘细菌的分离提供了新思路与途径。

关键词: 被捕食菌, 盐碱地, 粘细菌, 分离

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 04-0379-11

粘细菌是一类可滑行运动的单细胞革兰氏阴性杆状细菌, 具有复杂的多细胞行为和生活史^[1-2]。在一定的环境条件下, 粘细菌可形成不同于其他原核生物的子实体结构^[1]。粘细菌能产生丰富的次级代谢产物, 迄今已经从粘细菌中分离到了 500 多种结构新颖的次级代谢产物^[3], 是具有极大药用价值的微生物类群。

粘细菌广泛的存在于土壤中, 据估计 1g 土壤

中约含 10^6 个粘细菌^[4-6]。但是由于受其分离纯化手段的限制, 迄今为止粘细菌已经确定的分类类群只有 23 个属 50 多个种^[7-10], 这严重地阻碍了粘细菌的相关研究。不断发展新的方法来分离和认识环境中尚未被分离培养的新的粘细菌种类, 对于获得新的微生物药物具有十分重要的意义。

根据粘细菌降解基质的不同, 可将粘细菌划分

基金项目: 国家自然科学基金 (31170009); 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开放基金课题重点项目 (BRZD1004)

* 通信作者: Tel: +86-20-87686803; Fax: +86-20-37656628; E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

作者简介: 李百元 (1987-) 男, 湖南永州人, 硕士研究生, 研究方向为粘细菌多样性研究及粘细菌分离。E-mail: lby245239@126.com

收稿日期: 2012-10-30; 修回日期: 2013-02-08

为两大生理类群:溶细菌群(Bacteriolytic group)和溶纤维群(Cellulolytic group),其中溶细菌类群不利用纤维素,只能分解利用细菌,而溶纤维素类群不能降解活细菌(可分解死细菌),但能分解利用纤维素^[11]。其中溶细菌类群包含了粘细菌的22个属,溶纤维群只包含纤维堆囊菌属(*Sorangium*)和*Byssovorax cruenta*^[12-13]。许多粘细菌能捕食其他细菌为食,来满足自身生长繁殖的需要,不同粘细菌对不同类群被捕食细菌的捕食能力不同,对革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌的敏感程度也不一样,研究表明其更偏好于革兰氏阴性菌^[14-15]。本文以新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌为研究对象,尝试利用分离筛选的细菌作为被捕食菌来诱导分离新疆盐碱地的粘细菌,以期获得新的粘细菌资源,提高粘细菌分离效率,为粘细菌分离提供一种新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样的采集:

从新疆阿克苏地区盐碱地区域采集土壤样品25份,为了防止霉菌生长,采集后立即自然风干,于4℃条件下保存备用。

1.1.2 主要培养基及仪器设备:培养基主要包括①VY/2培养基^[5,16-17]:0.5%安琪酵母;0.1%CaCl₂·2H₂O;0.5 μg/mL VB₁₂;1.5%琼脂粉;pH 7.2。②NA培养基^[18]:1.0%蛋白胨;0.3%牛肉膏;0.5%NaCl;1.5%琼脂粉;pH7.2-7.4。③LB液体培养基:1.0%蛋白胨;0.5%酵母膏;1.0%氯化钠;pH7.0。④CY培养基^[19]:0.25%胰蛋白胨;0.1%酵母提取物;0.1%CaCl₂·2H₂O;1.5%琼脂粉;pH值7.2。⑤Gibbons培养基^[20]:0.5%酪素水解物;0.5%胰蛋白胨;1.0%酵母浸出物;0.3%柠檬酸三钠;2.0%MgSO₄·7H₂O;0.2%KCl;1.5%琼脂粉;pH7.2-7.4。仪器设备主要包括冷冻离心机3K30C,德国SIGMA公司;PCR扩增仪GeneAmp PCRsystem 2400,德国PE公司;恒温培养箱GHP-9160,上海一恒科技公司;超净工作台SW-CI4F,AIR TECH公司;凝胶成像系统BST-20,英国UVI公司;体式显微镜,瑞士LEICA公司。

1.2 土样的预处理

用制霉菌素(终浓度为20 μg/mL)浸泡土壤过

夜8000×g离心10 min收集土样。

1.3 被捕食细菌的分离及筛选

采用稀释涂布平板法^[21],称取10 g混合土壤(5#、7#、8#),加入到含有玻璃珠的100 mL无菌水中,震荡悬浮,吸取100 μL土悬液,于NA、GM培养基上涂布,37℃培养48 h,挑取单菌落,划线纯化,于斜面及甘油管保藏。从分离到的细菌中筛选出能诱导粘细菌形成子实体的细菌,作为诱导粘细菌分离的捕食菌:将分离到的这些细菌在CY平板上划线,37℃培养48 h,再将处理后的4个土壤9#、25#、21#、22#分别接入已经长满菌体的CY平板上,30℃培养4 d后,体式显微镜下观察粘细菌子实体,根据出现子实体的时间、数量、形态,从中筛选出能较好诱导粘细菌形成子实体的细菌,将其作为新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌分离的捕食菌株。对被捕食细菌的16S rRNA基因序列进行测定、分析,从而对其进行鉴定。

1.4 粘细菌的分离

将筛选到的被捕食细菌接于LB液体培养基中,37℃震荡培养48 h,8000×g离心10 min,留100 μL液体作为细菌悬液,将细菌悬液涂布于CY平板上或于CY平板上划细密的线条,待细菌长满平板后接入用制霉菌素处理过的土壤,30℃下诱导分离粘细菌,各做2个重复。

1.5 粘细菌和被捕食细菌DNA的提取以及16S rRNA基因序列的扩增

采用改良CTAB法^[22]提取粘细菌和被捕食细菌纯培养物DNA,利用纯培养物DNA作为模板扩增16S rRNA基因序列。PCR扩增采用细菌通用引物:正向引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物1492R:5'-TACCTTGTACGACTT-3'-^[23-24]。PCR产物由上海英俊生物公司测序,所得序列递交GenBank。

1.6 粘细菌系统发育树构建

递交分离到的粘细菌16S rRNA基因序列于EzTaxon(www.Eztaxon.org)和NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)上进行比对,选取与其相似度最高的模式种16S rRNA基因序列,再从GenBank中获取一株与粘细菌亲缘关系较远的模式菌株作为构建系统发育树的外类群。利用Clustalx进行完全比对,并运行MEGA4.1软件中Neighbor-Joining构建系统发育树^[25-26]。

1.7 粘细菌的初步鉴定

依据《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》^[27]和《Prokaryotes》^[28]第二版的粘细菌分类标准:于体式显微镜、光学显微镜下对粘细菌的菌落形态、子实体的大小和形态进行观察,根据这些特征对其进行初步的鉴定及分类定位,并对其16S rRNA基因序列进行测序分析,进一步确定其分类地位。

2 结果和分析

2.1 被捕食细菌分离、筛选及鉴定

通过观察平板上的菌落形态,挑出25株菌落形态不同的细菌,编号为xj1,xj2,xj3……xj25。通过诱导粘细菌子实体形成试验发现,其中25株细菌中的16株能够诱导粘细菌子实体的形成(图1),将其确定为诱导粘细菌的被捕食细菌。这些被捕食细菌诱导形成的粘细菌子实体都能扩展到培养基上,子实体的数量多,易于挑取和纯化,其他9株细菌不能诱导粘细菌子实体的形成,或诱导形成的子实体很小,数量也很少,不易于挑取纯化。根据16S rRNA基因序列分析结果表明:16株细菌中3株为*Bacillus anthracis*;2株为*Bacillus jeotgali*;2株为*Pseudochrobactrum asaccharolyticum*;2株为*Advenella kashmirensis*; *Bacillus flexus*、*Pseudomonas geniculata*、*Bacillus oceanisediminis*、*Microvirga aerophilus*、*Achromobacter denitrificans*、*Bacillus humi*和*Bacillus horneckiae*各有1株;其中7株属于革兰氏阴性菌,9株为革兰氏阳性菌。

2.2 粘细菌的分离及初步鉴定

采用被捕食细菌诱导粘细菌形成子实体的分离方法,从新疆阿克苏盐碱地25个土样中共分离到55株粘细菌,其中有6株疑似粘细菌尚未纯化鉴定,其子实体形态见图2。这6株疑似粘细菌在VY/2和CY培养基上具有明显的滑行运动现象,个别菌株具有降解滤纸的能力。将这6株菌于NA平板上划线培养,结果显示有菌体生长,但未见有子实体形成而且菌落的形态与颜色也不同于VY/2,这可能是混在其中的细菌的生长。

土壤是粘细菌适宜的栖息地,孕育着大量的粘细菌资源。研究表明,粘细菌的分布与土壤的性质有关如有机质含量高的土壤中粘细菌数量也

较多,土壤中常见的粘细菌有*Nannocystis exedens*,*Coralloccoccus coralloides*,*Sporangium cellulorum*,*Myxococcus fulvus*等^[28]。本研究从新疆盐碱地分离到55株粘细菌,根据体视镜下观察到的子实体的形态及菌落特征(图3)再结合16S rRNA基因序列分析来确定其分类地位,分离到的粘细菌属和种的总体分布见表1。从表1可以看出,新疆阿克苏盐碱地中粘细菌的种类较少,可分离粘细菌多样性不高;其中粘球菌属(*Myxococcus*)出现的频率最高、种类多而且也最容易被纯化,这说明盐碱地土壤中粘球菌属的含量较高;珊瑚球菌属(*Coralloccoccus*)、侏囊菌属(*Nannocystis*)也较容易分离,但*Pyxidicoccus*出现的频率最低,仅分离到1株,说明盐碱地中*Pyxidicoccus*含量较低。其中侏囊菌(*Nannocystis*)在盐碱地土壤中比较常见,也比较容易分离,在被捕食细菌存在的情况下(诱导平板),能很好地捕食被捕食细菌,生长速度较快,菌体明显,并且在CY培养基上也未出现明显的降解培养基现象(见图3.H和I);但在没有被捕食细菌的情况下(侏囊菌纯菌),其在CY培养基上具有明显的降解琼脂的现象,而且生长速度很慢。此外,因侏囊菌(*Nannocystis*)纯菌能降解培养基,生长速度慢,菌体不明显,这增加了其纯化难度。

张鲜娇等^[29]采用传统的分离技术对新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌进行分离(见表2),她们选用的土样与本研究选用的土样均来自于新疆阿克苏地区盐碱地。从表2中可以得出利用大肠杆菌诱导技术分离到的粘细菌只有32株,且只包含了粘球菌属(*Myxococcus*)、珊瑚球菌属(*Coralloccoccus*)、孢囊杆菌属(*Cystobacter*)及多囊菌属(*Polyangium*)。采用滤纸培养法也只分离到20株,而兔粪诱导法仅仅分离到2株粘细菌,本研究采用基于被捕食细菌诱导粘细菌子实体形成的分离技术共分离到55株粘细菌(见表2)。采用被捕食细菌筛选粘细菌,其出菌率明显高于大肠杆菌诱导法、滤纸培养法及兔粪诱导法的,而且分离到的粘细菌的种类也有一些异同于这3种方法。本研究分离到的*Pyxidicoccus*及*Nannocystis*在大肠杆菌诱导中未见有分离,同时大肠杆菌分离到的*Polyangium*在本研究中未见分离。由此可见本研究在粘细菌的分离中具有一定的优势和可行性。

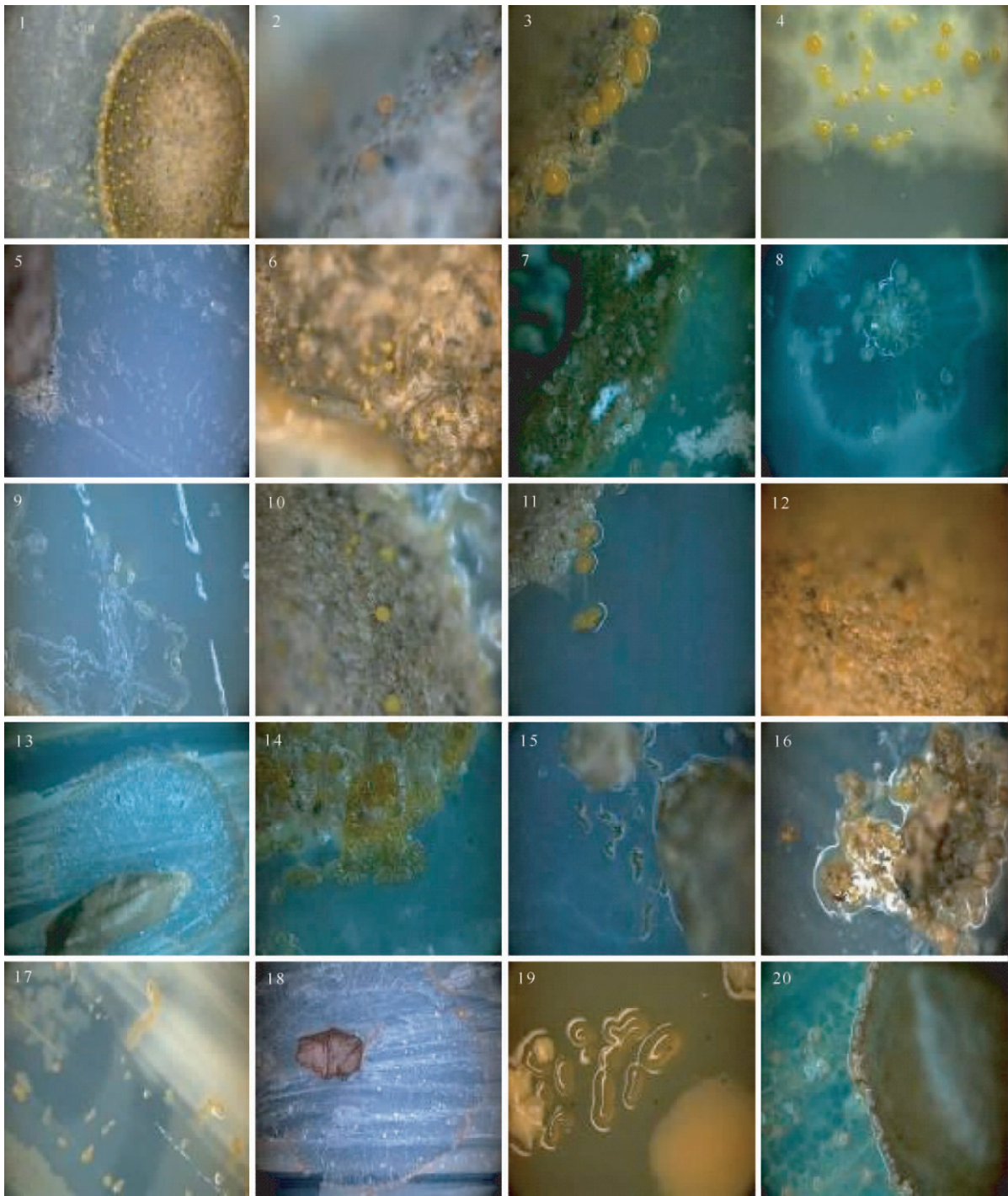


图 1. 利用被捕食细菌诱导粘细菌形成的子实体

Figure 1. Fruiting body of myxobacteria formed by prey strains. 1 and 12: xj1-*Bacillus jeotgali*; 2: xj25-*Bacillus flexus*; 3: xj10-*Bacillus oceanisediminis*; 4: xj3-*Bacillus anthracis*; 5 and 19: xj5-*Bacillus humi*; 6: xj14-*Microvirga aerophilus*; 7: xj15-*Bacillus humi*; 8: xj21-*Bacillus anthracis*; 9: xj20-*Pseudomonas geniculata*; 10: xj24-*Pseudochrobactrum asaccharolyticum*; 11: xj13-*Achromobacter denitrificans*; 13: xj12-*Advenella kashmirensis*; 14 and 20: xj4-*Bacillus anthracis*; 15: xj23-*Bacillus horneckiae*; 16 and 18: xj11-*Advenella kashmirensis*; 17: xj9-*Bacillus jeotgali*.

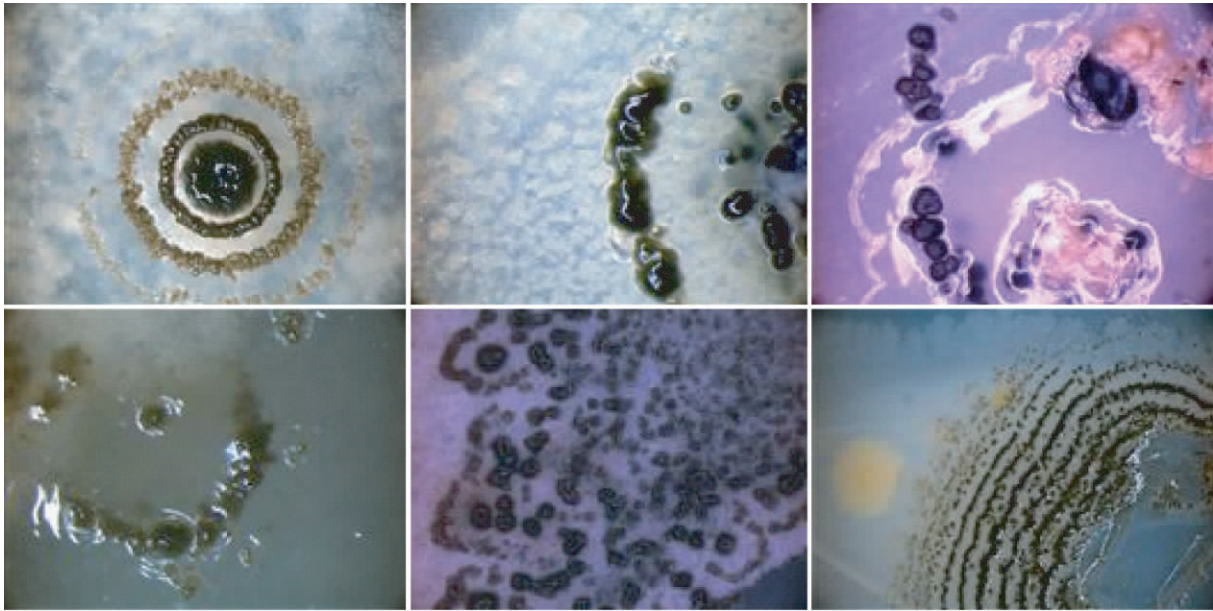


图 2.6 株疑似粘细菌的形态特征

Figure 2. Six unpurified and identified to be myxobacteria by fruiting body.

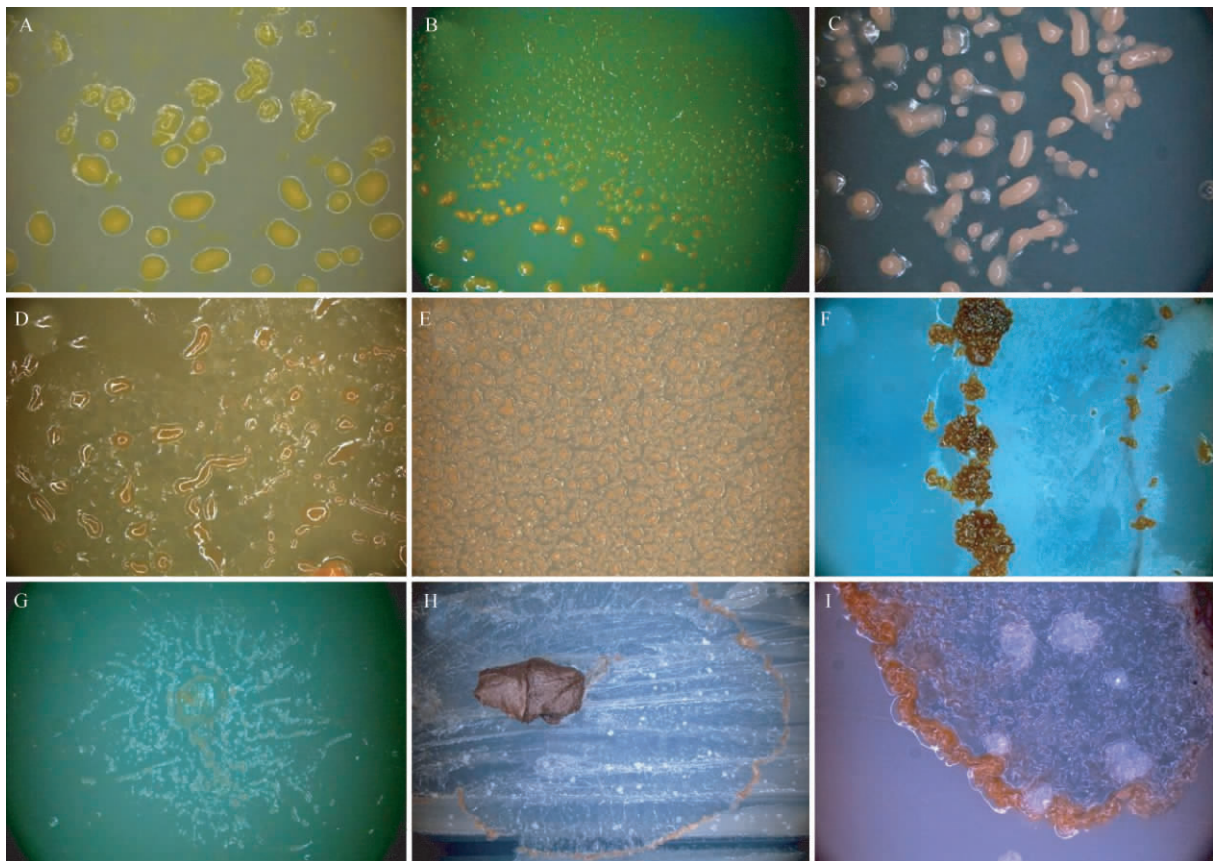


图 3. 分离到的部分粘细菌子实体及其菌落图片

Figure 3. Morphological characteristics of some isolated Myxobacteria strains. A: *Myxococcus xanthus*; B: *Myxococcus virescens*; C: *Myxococcus fulvus*; D: *Corallocooccus macrosporus*; E: *Corallocooccus exiguus*; F: *Cystobacter violaceus*; G: *Pyxidicooccus fallax*; H: *Nannocystis exedens*; I: *Nannocystis pusilla*.

(M94374.1)、*Stigmatella hybrida* DSM 14722^T (NR-043952.1)、*Angiococcus disciformis* DSM 52716^T (HE582771.1)、*Pyxidicoccus fallax* DSM 14698^T (DQ768123.1)、*Nannocystis pusilla* DSM 14622^T (FR749907.1)、*Nannocystis exedens* DSM 71^T (AB084253.1)、*Myxococcus xanthus* ATCC 25232^T (DQ768116.1)、*Myxococcus virescens* NBRC 100334^T (AB218225.1)、*Myxococcus stipitatus* DSM 14675^T (DQ768118.1)、*Myxococcus fulvus* ATCC 25199^T (DQ768117.1)、*Cystobacter violaceus* DSM 14727^T (DQ768114.1)、*Corallocooccus macrosporus* DSM

14697^T (AJ811623.1)、*Corallocooccus exiguus* DSM 14696^T (DQ768121.1)。从 GenBank 中获取与粘细菌亲缘关系远的菌株 *Helicobacter pylori* NCTC 11637^T (Z25741.1) 作为外类群, 基于 16S rRNA 基因序列的相似性而构建的系统发育树见图 4。

2.4 被捕食细菌与被诱导的粘细菌的相关关系

根据粘细菌对不同的细菌种类食性的不同, 利用 16 株细菌作为诱导粘细菌的被捕食菌株, 结果分离到 55 株粘细菌, 其中分离到的 6 株为未曾被分离或诱导出来的菌株, 进一步的纯化鉴定还在进行中。被捕食细菌与其对应粘细菌种类的关系见表 3。

表 3. 被捕食细菌与其对应诱导的粘细菌

Table 3. Prey strains and myxobacteria strains

Prey strains	Isolated myxobacteria by prey strains
<i>Bacillus jeotgali</i> . xj1	<i>Pyxidicoccus fallax</i> ; <i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus fulvus</i>
<i>Bacillus jeotgali</i> . xj9	<i>Corallocooccus macrosporus</i> ; <i>Myxococcus Xanthus</i> ; <i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Cystobacter violaceus</i>
<i>Bacillus humi</i> . xj15	<i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus xanthus</i> ; <i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Pyxidicoccus fallax</i> ; <i>Nannocystis</i> sp
<i>Bacillus anthracis</i> . xj21	<i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Myxococcus xanthus</i>
<i>Bacillus horneckiae</i> . xj23	<i>Myxococcus Xanthus</i> ; <i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus fulvus</i>
<i>Pseudochroacterum asaccharolyticum</i> . xj24	<i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus xanthus</i> ; <i>Myxococcus fulvus</i>
<i>Bacillus flexus</i> . xj25	<i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Corallocooccus exiguus</i>
<i>Pseudomonas geniculata</i> . xj20	<i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Nannocystis exedens</i> ; <i>Myxococcus xanthu</i> ; <i>Myxococcus virescens</i>
<i>Bacillus oceanisediminis</i> . xj10	<i>Myxococcus xanthus</i> ; <i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Myxococcus stipitatus</i> ; <i>Nannocystis</i> sp
<i>Advenella kashmirensis</i> . xj11	<i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Nannocystis pusilla</i> ; <i>Cystobacter</i> sp
<i>Advenella kashmirensis</i> . xj12	<i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Myxococcus xanthus</i> ; <i>Nannocystis</i> sp
<i>Pseudochroacterum asaccharolyticum</i> . xj5	<i>Myxococcus xanthus</i> ; <i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Corallocooccus exiguus</i>
<i>Microvirga aerophilus</i> . xj14	<i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Myxococcus xanthus</i> ; <i>Nannocystis exedens</i>
<i>Achromobacter denitrificans</i> . xj13	<i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Myxococcus xanthus</i>
<i>Bacillus anthracis</i> . xj3	<i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Myxococcus xanthus</i> ; <i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Nannocystis</i> sp
<i>Bacillus anthracis</i> . xj4	<i>Myxococcus fulvus</i> ; <i>Myxococcus xanthus</i> ; <i>Myxococcus virescens</i> ; <i>Nannocystis</i> sp

从表 3 可以得出, 革兰氏阳性细菌(芽孢菌)能诱导出粘球菌属、珊瑚球菌属、*Pyxidicoccus*、孢囊杆菌属、侏囊菌属, 而革兰氏阴性细菌能诱导出粘球菌属、珊瑚球菌属、孢囊杆菌属、侏囊菌属; *Myxococcus fulvus*、*Myxococcus virescens* 均能被 16 株被捕食细菌诱导出来; *Myxococcus xanthus* 能被 12 株被捕食菌株诱导出来, 其中包括 7 株革兰氏阴性菌株; 而 *Pyxidicoccus* 能被 *Bacillus jeotgali* 诱导出来; *Bacillus flexus*、*Bacillus jeotgali* 能诱导出 *Corallocooccus*; *Bacillus jeotgali* 和 *Bacillus jeotgali* 能诱导出 *Cystobacter*; 而 *Nannocystis* 既能被革兰氏阳性菌又能被革兰氏阴性菌诱导出来。其中 *Pyxidicoccus* 及 *Cystobacter* 只捕食了革兰氏阳性菌, 这与文献中报

道的粘细菌偏好于捕食革兰氏阴性菌不完全相同, 可能是因为粘细菌的分离环境与粘细菌捕食实验的环境条件不一样, 前者更为复杂, 并且不同粘细菌的捕食能力和嗜好也不一样。粘球菌(特别是黄色粘球菌、变绿粘球菌)的捕食菌谱较其他粘细菌的捕食菌谱大, 能更容易被诱导出来, 而孢囊杆菌、*Pyxidicoccus* 的捕食菌谱相对较少, 分离相对较困难, 但在其被捕食菌存在下也能被诱导出来。

3 讨论

郑贺云等^[30]通过对新疆阿克苏地区盐碱地细菌类群多样性及优势菌群分析, 发现盐碱地细菌的

种类比较丰富,并且通过 DGGE 分析发现盐碱地中存在大量未培养或难培养的微生物资源,粘细菌作为捕食型细菌,其种类可能也会比较多。本研究利用被捕食菌诱导粘细菌形成子实体的方法及张鲜娇等^[29]利用传统的分离方法对新疆盐碱地粘细菌进行分离,结果发现可分离粘细菌种类并不丰富。分析原因可能有如下:①粘细菌本身的特性决定的^[31];②局限于粘细菌的分离纯化方法^[6];③粘细菌受被捕食菌的密度及捕食环境等因素的影响^[14-15,32]。

微生物在维持生态稳定及调节营养循环中起到重要的作用^[33-34],而捕食微生物可能通过捕食其他的微生物来控制微生物的数量,并通过影响微生物的群体结构来影响着这些进程^[14]。但是,到目前为止,捕食微生物在生态群落中作用的研究并不多。具有捕食能力的原核微生物有蛭弧菌(*Bdellovibrionaceae*)、剑菌属(*Ensifer*)和粘细菌(*myxobacteria*)等,它们的捕食策略各不相同^[35]。目前,研究最多的捕食微生物是蛭弧菌,这类细菌能利用鞭毛进行运动,但只能捕食革兰氏阴性细菌,而对于捕食革兰氏阳性菌还没有报道^[36-38]。同为 δ 变形菌纲的粘细菌也能捕食其他的微生物,但这两种微生物的捕食机制完全不同。蛭弧菌是以寄生的形式进入其他微生物体内,再裂解细胞^[39];而粘细菌产生大量的次级代谢产物如裂解酶等裂解其他的微生物,再从中获取营养物质^[40]。此外,粘细菌不仅能捕食革兰氏阴性菌也能捕食革兰氏阳性菌,而且其更易捕食革兰氏阴性菌^[14],更为重要的是其对于活的和杀死后的被捕食菌的敏感度是一样的。这些偏好性可能与被捕食细菌细胞壁的构成不同有关,事实上,革兰氏阳性菌的细胞壁结构更为复杂,肽聚糖含量高,不易被溶壁酶降解。而本研究分离到的 *Pyxidicoccus* 在条件相同的情况下只捕食了革兰氏阳性菌,这与报道的结果不一致,说明可能存在其他的机制捕食被捕食细菌如不同粘细菌的次级代谢产物的不同,各种溶壁酶的种类也可能不同等。

有研究报道,在固体培养上,不同粘细菌对捕食菌敏感度也不一样,如 *Myxococcus* 和 *Angiococcus* 裂解被捕食菌的能力要比 *Archangium* 和 *Chondrococcus* 强,*Chondrococcus* 裂解捕食菌的能力

最弱^[41]。粘细菌的捕食行为不仅受被捕食菌的类型影响,而且还受被捕食菌密度和培养基硬度的影响^[31],此外在被捕食阶段被捕食菌处于生长或繁殖状态也可能影响粘细菌的捕食行为^[38]。研究粘细菌与被捕食菌之间的关系,有助于丰富和发展新的粘细菌分离技术如利用大肠杆菌诱导粘细菌的分离已经举得了相当的成绩并且已广泛地用于分离粘细菌。本研究利用 16 株不同的细菌作为被捕食菌来诱导盐碱地土壤粘细菌的分离,捕食关系是建立在被捕食菌处于生长繁殖状态下,结果证实利用不同的被捕食菌来诱导粘细菌的分离可以获得更多的粘细菌,并且粘细菌分离及后续纯化也更容易。不同被捕食菌诱导的粘细菌种类也有差异,这也说明粘细菌对不同细菌的捕食能力及敏感度不同。但该方法在分离粘细菌的同时,也能分离到其他的捕食细菌,这些捕食细菌常常干扰了粘细菌的分离纯化,尤其是侏囊菌,其生长缓慢,形成的子实体小、不易挑取,在分离中常常与其他具有运动能力的细菌混在一起,不易于纯化。

研究利用处于生长繁殖时期的细菌诱导土壤粘细菌的分离,有助于研究粘细菌与被捕食菌之间的动态关系。粘细菌对捕食菌的捕食能力及敏感度可能不仅受菌株本身的影响,也有可能受菌株在生长代谢过程中产生的代谢产物包括初级代谢产物和次级代谢产物的影响。大部分粘细菌在固体平板上具有裂解活的细菌的能力,甚至有部分粘细菌能裂解酵母等真核生物,深入地研究粘细菌的捕食行为有可能发现具有经济价值的抗生素。

参考文献

- [1] Shimkets LJ. Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1990, 54(4): 473-501.
- [2] Dworkin M. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(1): 70-102.
- [3] Weissman KJ, Mueller R. Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action. *Natural Product Reports*, 2010, 27(9): 1276-1295.
- [4] Reichenbach H. The ecology of the myxobacteria. *Environmental Microbiology*, 1999, 1(1): 15-21.

- [5] Reichenbach H. Biology of the myxobacteria: ecology and taxonomy. // Dworkin M, Kaiser AD. In *Myxobacteria II*. ed. Washington DC: American Society for Microbiology. 1993: 13-62.
- [6] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 403-427.
- [7] Shimkets LJ, Dworkin M, Reichenbach H. The myxobacteria. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*. 3rd eds. New York: Springer-Verlag. 2006, 7: 31-115.
- [8] Iizuka T, Jojima Y, Hayakawa A, Fujii S, Yamanaka S, Fudou R. *Pseudoehyngromyxa salsuginis* gen. nov., sp. nov. a myxobacterium isolated from an estuarine marsh. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, doi: 10.1099/ijs.0.040501-0.
- [9] Garcia RO, Reichenbach H, Ring MW, Muller R. *Phaselicystis flava* gen. nov., sp. nov., an arachidonic acid-containing soil myxobacterium, and the description of *Phaselicystidaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(6): 1524-1550.
- [10] Kathrin IM, Ronald OG, Klaus G, Herbert I, Rolf M. *Sandaracinus amylolyticus* gen. nov., sp. nov., a starch-degrading soil myxobacterium, and description of *Sandaracinaceae* fam. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(5): 1191-1198.
- [11] Li YZ, Li J, Zhou L, Zhang Y, Hu W. Isolation and identification of myxobacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2000, 40(6): 652-656. (in Chinese)
李越中, 李健, 周璐, 张勇, 胡玮. 我国粘细菌 (Myxobacteria) 资源的分离与鉴定. *微生物学报*, 2000, 40(6): 652-656.
- [12] Morgan AD, MacLean RC, Hillesland KL, Velicer GJ. Comparative analysis of myxococcus predation on soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(20): 6920-6927.
- [13] Reichenbach H, Lang E, Schumann P, Spröer C. *Byssovorax cruenta* gen. nov., sp. nov., nom. rev., a cellulose-degrading myxobacterium: rediscovery of 'Myxococcus cruentus' Thaxter 1897. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 6(10): 2357-2363.
- [14] Ronald G, Klaus G, Marc S, Irineo J, Dogma J, Rolf M. Expanded phylogeny of myxobacteria and evidence for cultivation of the 'unculturable'. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 57(2): 878-887.
- [15] Berleman JE, Scott J, Chumley T, Kirby JR. Predatation behavior in *Myxococcus xanthus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(44): 17127-17132.
- [16] Brockman ER, Boyd WL. Myxobacteria from soils of alaskan and canadian arctic. *Journal of Bacteriology*, 1963, 86(3): 605-606.
- [17] Brockman ER. Myxobacters from arid mexican soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 1976, 32(4): 642-644.
- [18] Zhu YB, Shi FY, Wang LL, Tian JQ, Xiang MC, Liu XZ. Diversity of bacteria isolated from cysts *Heterodera glycines* in Heilongjiang. *Acta Microbiologica Sinica*. 2012, 52(7): 902-909. (in Chinese)
朱英波, 史凤玉, 王牛牛, 田建卿, 向梅春, 刘杏忠. 黑龙江大豆胞囊线虫胞囊可培养细菌多样性. *微生物学报*, 2012, 52(7): 902-909.
- [19] Reichenbach H. A simple method for the purification of myxobacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 1983, 1(2): 77-79.
- [20] Sehgal SN, Gibbons NE. Effect of some metal ions on the growth of halobacterium-cutirubrum. *Canadian Journal of Microbiology*, 1960, 6(2): 165-169.
- [21] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986.
- [22] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4326.
- [23] Brosius JJ, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF. Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 1981, 148(20): 107-127.
- [24] Brunel B, Givaudan A, Lanois A, Akhurst RJ, Boemare N. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA gene. *Applied and Environmental*

- Microbiology , 1997 , 63(2) : 574-580.
- [25] Yang L , Deng Y , Zhang H , Diao QY. Isolation and characterization of an *Enterococcus* strain from Tibetan alpine meadow soil. *Acta Microbiologica Sinica*. 2012 , 52 (11) : 1421-1426. (in Chinese)
杨磊 , 邓宇 , 张辉 , 刁青云. 一株分离自西藏高山草甸土壤的肠球菌的分离鉴定及代谢特征. *微生物学报* , 2012 , 52(11) : 1421-1426.
- [26] Murcia AJ , Collins MD. *Enterococcus sulfurous* , a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiology Letters* , 1991 , 80(1) : 69-73.
- [27] Reichenbach H. The Myxococcales. In: Garrity GM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Part 3: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon-proteobacteria. 2nd eds , New York: Springer-Verlag , 2005: 1059-1143. .
- [28] Reichenbach H , Dworkin M. The Myxobacteria. // Balous A , et al. The Prokaryote. 2nd ed. New York: Spriger-Verlag , 1992: 3418-3487.
- [29] Zhang XJ , Li ZK , Tan ZY , Guo J , Zhu HH. Isolation and identification of myxobacteria in the saline-alkaline soils of Akesu in Xinjiang. *Acta Microbiologica Sinica*. 2012 , 52(2) : 160-168. (in Chinese)
张鲜姣 , 黎志坤 , 谭志远 , 郭俊 , 朱红惠. 新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌分离鉴定. *微生物学报* , 2012 , 52(2) : 160-168.
- [30] Zhen HY , Li ZK , Li C , Zhang XJ , Hu JW. Analysis of the bacterial diversity and dominant population in Akesu Saline-alkali in Xinjiang. *Microbiology* , 2012 , 39 (7) : 1031-1043. (in Chinese)
郑贺云 , 黎志坤 , 李超 , 张鲜姣 , 胡建伟 , 朱红惠. 新疆阿克苏地区盐碱地细菌类群多样性及优势菌群分析. *微生物学通报* , 2012 , 39(7) : 1031-1043. (in Chinese)
- [31] Li YZ , Li J. Isolation and purification of myxobacteria. *Microbiology* , 1997 , 24(4) : 237-240.
李越中 , 李建. 粘细菌的分离与纯化. *微生物学通报* , 1997 , 24(4) : 237-240.
- [32] Kristina LH , Richard EL , Gregory JV. Ecological variables affecting predatory success in *Myxococcus xanthus*. *Microbial Ecology* , 2007 , 53(4) : 571-578.
- [33] Falkowski PG , Fenchel T , Delong EF. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. *Science* , 2008 , 320(5879) : 1034-1039.
- [34] Liu H , Nolla HA , Campbell L. *Prochlorococcus* growth rate and contribution to primary production in the equatorial and subtropical North Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* , 1997 , 12(1) : 39-47.
- [35] Mark OM. Predatory prokaryotes: an emerging research opportunity. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* , 2002 , 4(5) : 467-477.
- [36] Lambert C , Morehouse KA , Chang CY , Sockett RE. *Bdellovibrio*: growth and development during the predatory cycle. *Current Opinion in Microbiology* , 2006 , 9 (6) : 639-644.
- [37] Marbach A , Varon M , Shilo M. Properties of marine *Bdellovibrios*. *Microbial Ecology* , 1976 , 2(4) : 284-295.
- [38] Mignot T , Shaevitz JW , Hartzell PL , Zusman DR. Evidence that focal adhesion complexes power bacterial gliding motility. *Science* , 2007 , 315(5813) : 853-856.
- [39] Morgan AD , MacLean RC , Hillesland KL , Velicer GJ. Comparative analysis of myxococcus predation on soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* , 2010 , 76 (20) : 6920-6927.
- [40] Xiao Y , Wei X , Ebright R , Wall D. Antibiotic production by myxobacteria plays a role in predation. *Journal of Bacteriology* , 2011 , 193(18) : 4626-4633.
- [41] Shigeru Y , Sawa K , Ryosuke F. Lysis of basidiomycetous yeast , *Rhodotorula glutinis* caused by myxobacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* , 1993 , 39 (4) : 419-427.

Influence of different prey strains on isolation of myxobacteria in saline-alkaline soils of Xinjiang

Baiyuan Li^{1 2 3}, Xiaolin Xie², Xianjiao Zhang², Zhuoping Cai², Honghui Zhu^{2*}

¹South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China

²Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Provincial Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangzhou 510070, China

³Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract [Objective] We isolated myxobacteria in saline-alkaline soils of Xinjiang using a prey-predator strategy where the prey bacteria can induce the predator myxobacteria to form visible fruiting body, and evaluated intrinsic relationships between prey and predator myxobacteria. **[Methods]** Sixteen bacteria with inductive effects of fruiting body formation were obtained, and then used as preys to isolate the myxobacteria. **[Results]** A total of 55 myxobacteria strains were isolated from 25 soil samples, which were identified to the genera of *Myxococcus*, *Coralloccoccus*, *Pyxidicoccus*, *Cystobacter*, and *Nannocystis*. Besides, 6 unpurified isolates were believed to be myxobacteria. All the 16 prey bacteria had preferable inductive effects on *Myxococcus* spp., whereas *Pyxidicoccus* spp. and *Cystobacter* spp. were only induced by Gram-positive strains. **[Conclusion]** The prey-predator strategy provided a new and more effective way to isolate myxobacteria.

Keywords: prey bacteria, saline-alkaline soils, myxobacteria, isolation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(31170009) and by the Open Foundation of Tarim University (BRZD1004)

* Corresponding author. Tel: +86-20-87686803; Fax: +86-20-37656628; E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

Received: 30 October 2012/Revised: 8 February 2013

《微生物学报》审稿程序

本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后送外审。将请2位专家进行审阅,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。