

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (2) :183 - 190; 4 February 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsx.2014.02.007

新疆阜康盐碱地可培养兼性嗜碱放线菌多样性及其酶活筛选

张永光¹, 刘晴², 王宏飞¹, 张道锋¹, 陈吉岳¹, 张元明¹, 李文均^{1,2*}

¹中国科学院新疆生态与地理研究所, 干旱区生物地理与生物资源重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830011

²云南大学省微生物研究所, 西南生物多样性教育部重点实验室, 云南 昆明 650091

摘要: 【目的】分析新疆阜康盐碱地环境可培养兼性嗜碱放线菌物种多样性及其产酶潜力。【方法】从阜康盐碱地环境共采集 10 份土样, 采用纯培养物的 16S rRNA 基因序列同源性分析盐碱地兼性嗜碱放线菌物种多样性。对分离菌株进行淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶和木聚糖酶酶活初筛。【结果】从 10 份土样中共分离到 116 株兼性嗜碱放线菌和 4 株耐碱放线菌, 16S rRNA 基因序列分析表明它们分布在放线菌门放线菌纲的 8 个目 13 个科 22 个属, 其中 53.3% 的菌株为非链霉菌属和拟诺卡氏菌属的菌株。酶活初筛结果: 淀粉酶、蛋白酶、木聚糖酶和纤维素酶的阳性率分别为 35.8%、37.5%、28.3%、17.5%。【结论】阜康盐碱地生境蕴藏丰富的兼性嗜碱放线菌资源。兼性嗜碱放线菌是获得高活性酶的资源。本研究有助于认识高碱环境兼性嗜碱放线菌的多样性, 为其资源的开发利用提供依据。

关键词: 盐碱地, 兼性嗜碱放线菌, 多样性, 酶

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2014) 02-0183-08

盐碱地 (Saline alkali land) 指表层含盐碱成分且生长有天然耐盐植物的土地。我国盐碱地面积为 9913 万公顷, 约为全世界的 10%, 主要分布在淮河以北、西北及新疆、青藏高原等内陆干旱、半干旱地区。盐碱地的形成严重制约了农业发展, 但盐碱地也是很珍贵的土地资源, 许多耐盐碱植物、大量微生物繁衍生息在这一特殊生境。开展盐碱地微生物资源的收集、嗜碱机制及其开发利用研究将会促进我国极端环境微生物学和生物产业的发展。

嗜碱放线菌 (Alkaliphilic actinobacteria) 是放线菌的一个特殊类群, 主要分布在一些天然的高碱环境, 如盐碱湖、盐碱地, 以及人为的碱性环境。长期对高碱环境的适应使其具有一些独特的生理学性质

和特殊的代谢机制, 能够产生一些具有抑菌、抗癌或抗原生动物等活性的代谢物质^[1-5]。同时, 嗜碱放线菌还能产生多种在洗涤剂、食品、造纸、纺织等领域具有潜在用途的碱性酶^[6-7]。目前, 对嗜碱放线菌多样性的研究较少, 一些学者从高盐碱环境经常重复分离菌株, 尤其是优势菌群 *Streptomyces* 和 *Nocardopsis* 属菌株^[8-9], 获得的物种较单一。

尽管嗜碱放线菌研究始于 20 世纪 80 年代, 但至今对其没有一个确切的定义。人们倾向借鉴 Yumoto 等对嗜碱菌的定义^[10], 即根据高碱环境细菌的最适生长 pH 在 7.0 左右或 9.0 以上分为耐碱菌、嗜碱菌, 而后者又分为兼性嗜碱菌 (在 pH8.0 以下可良好生长) 和专性嗜碱菌 (在 pH8.0 以下不生

基金项目: 中国科学院“百人计划”项目; 中国科学院“西部之光”项目 (RCPY201203)

* 通信作者。Tel: +86-991-7885441; Fax: +86-991-7823149; E-mail: wjli@ynu.edu.cn, liaact@hotmail.com

作者简介: 张永光 (1976 -), 男, 河南三门峡人, 从事嗜碱放线菌资源研究。E-mail: zhangyg@ms.xjb.ac.cn

收稿日期: 2013-05-21; 修回日期: 2013-10-13

长),因此目前从高碱环境分离到的嗜碱放线菌多为兼性嗜碱放线菌。阜康市位于天山东段北麓,准格尔盆地南缘,北部大部分为古尔班通古特沙漠。在阜康市的荒漠区、洪积冲积平原北部泉水溢出带、水库周围和雨水集聚等区域,分布有大面积的盐碱地,蕴藏有丰富的嗜碱微生物资源。本文采用纯培养方法对采自阜康盐碱地的10个土样进行菌株分离,16S rRNA基因序列同源性分析,进而检测产酶活性。本研究有助于拓展人们对兼性嗜碱放线菌多样性的认识,为我国兼性嗜碱放线菌资源的收集、保

护及开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:2012年7月从新疆阜康荒漠生态国家野外科学观测研究站及周边高碱环境采集了10份土样(土样环境数据见表1),置于4℃冰箱备用。

表 1. 阜康盐碱土样环境数据

Table 1. Sampling environmental data of the salt-alkaline soil at Fukang

soil sample number	sample site	east longitude	northern latitude	altitude/m	pH	total salt/(g/kg)
1	Surrounding of Fukang station (阜康站周边)	88.14°	44.37°	466.7	10.25	6.15
2	Surrounding of Fukang station (阜康站周边)	88.18°	44.30°	469.5	9.5	4.9
3	Surrounding of Fukang station (阜康站周边)	88.12°	44.23°	476.3	9.83	1.79
4	Edge of sand river (沙河边缘)	88.30°	44.52°	487.8	8.26	0.42
5	Edge of sand river (沙河边缘)	88.15°	44.38°	483.5	8.12	0.61
6	Surrounding of No. 6 lake (六运湖周边)	87.97°	44.19°	490.8	8.73	47.1
7	Surrounding of No. 6 lake (六运湖周边)	87.82°	43.13°	493.2	8.81	274.0
8	Road stretch edge of Fukang (公路渠边)	88.10°	44.30°	491.1	9.13	21.8
9	Sangong river (三工河乡)	88.11°	44.28°	485.3	9.21	15.7
10	Sangong river (三工河乡)	88.22°	44.16°	490.3	8.68	54.0

1.1.2 培养基:分离培养基(g/L):(1)改良纤维素酪素琼脂(CCMS)^[11]:微晶纤维素10,酪素0.3, KNO₃2.0, MgSO₄·7H₂O 0.05, FeSO₄·7H₂O 0.1, K₂HPO₄0.2, CaCO₃0.05, NaCl 10.0, 琼脂15, 纯水1 L。(2)甘油天门冬酰胺琼脂(ISP5):甘油10.0, L-天门冬酰胺1.0, K₂HPO₄1.0, 微量盐1 mL, 琼脂15, 纯水1 L。微量盐溶液:FeSO₄·7H₂O 0.1 g; MnCl₂·4H₂O 0.1 g; ZnSO₄·7H₂O 0.1 g; 蒸馏水100 mL。(3)淀粉酪素琼脂:可溶性淀粉20, 酪素0.3, KNO₃2.0, MgSO₄·7H₂O 0.05, NaCl 2.0, K₂HPO₄2.0, CaCO₃0.02, FeSO₄·7H₂O 0.01, 琼脂15, 纯水1 L。微量盐溶液,1 mL, 配方同上。传代培养基(H1)(g/L)^[6]:葡萄糖10.0, 蛋白胨5.0, 酵母膏5.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, K₂HPO₄1.0, 琼脂15, 纯水1 L。以上培养基经121℃灭菌30 min后,用10 mol/L NaOH将pH调至10.0。

1.1.3 主要试剂和仪器:脱脂奶粉(skim milk)、酵

母提取物、蛋白胨购自美国BD公司,木聚糖和微晶纤维素购自美国Sigma公司, DNA Polymerase、dNTPs、DNA marker DL-2000、pMD18-T vector 购自TaKaRa公司,胶回收试剂盒购自上海生物工程有限公司。其他试剂均为国产分析纯试剂。PCR仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 样品的处理与菌株分离

土样在室温下自然干燥7天。取2 g土样于装有18 mL无菌水的三角瓶中,在30℃摇床160 r/min振荡30 min。土壤悬液经梯度稀释后涂布于分离培养基上,30℃培养3周。

1.3 16S rRNA 基因序列的测定及系统发育分析

微波法^[12]提取菌株基因组DNA。利用细菌16S rRNA基因通用引物,PA:(对应于*E. coli* 16S rRNA 5′8-27f)5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′; PB:(对应于*E. coli* 16S rRNA 3′1523-1504)5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′)进行PCR扩增。

扩增条件为: 95℃ 预变性 5 min; 35 个循环: 95℃ 变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min; 72℃ 总延伸 6 min。得到的 PCR 产物直接送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 对潜在新种 16S rRNA 基因 PCR 产物进行切胶回收、克隆, 然后送出测序。得到的序列用 Clustal X 软件^[13]进行序列比对, 然后用 MEGA 5^[14]软件 Neighbour-Joining 法^[15]进行系统进化树构建。

1.4 pH 生长范围实验

以 H1 为基础培养基(不添加 Na_2CO_3), 参照 Li 等的方法^[16], 利用 pH6.0 - 12.0 缓冲液体系(间隔 1.0), 检测分离菌株的 pH 生长范围及最适 pH。所使用的 pH 缓冲体系如下: pH 6.0 - 8.0, 0.1 mol/L KH_2PO_4 /0.1 mol/L NaOH; pH 9.0 - 10.0, 0.1 mol/L NaHCO_3 /0.1 mol/L Na_2CO_3 ; pH 11.0, 0.05 mol/L Na_2HPO_4 /0.1 mol/L NaOH; pH 12.0, 0.2 mol/L KCl/0.2 mol/L NaOH。在培养基灭菌结束后, 将其与缓冲液混合, 然后分装到无菌的玻璃试管中。接种实验菌株, 然后置于 30℃ 下培养 3 周。观察菌株生长情况。

1.5 酶活筛选

以 H1-1 培养基(营养物质浓度为 H1 的一半)为基础培养基, 分别添加 10 g/L 可溶性淀粉、20 g/L 脱脂牛奶、10 g/L 微晶纤维素钠、10 g/L 木聚糖, 在 115℃ 灭菌 25 min。pH 调节方法同前。活性的检测: 蛋白酶, 直接观察透明圈; 淀粉酶, 加入 5 mL 碘液(配方: 碘片 1 g, 碘化钾 2 g, 纯水 300 mL)覆盖平板, 直到清晰的透明圈出现; 纤维素酶和木聚糖酶: 加入 5 mL 0.1% 刚果红染液覆盖平板 1 h, 弃染液后用 5 mL 1.0 mol NaCl/L 溶液浸泡 20 min, 弃洗液, 阳性菌株可以观察到透明圈。活性记录方法: 活性圈半径 R - 菌落半径 r。

2 结果

2.1 兼性嗜碱放线菌多样性

从 10 份土样中共分离到 170 株放线菌, 去重复后为 120 株菌。测定的 16S rRNA 基因部分序列用 EzTaxon-e 与生效发表种属的比对, 选择各属代表菌株和相似性最高模式菌株 16S rRNA 基因序列经 Clustal X 比对后用 MEGA 5 构建系统进化树(图 1)。16S rRNA 基因序列分析结果表明, 120 株菌分

布在放线菌门放线菌纲 8 个目 13 个科 22 个属(见表 2)。其中, *Streptosporangiales*、*Streptomycetales*、*Micrococcales* 为盐碱地环境主要的放线菌菌群, 分别占分离菌株的 30.0%、25.8%、25.8%。*Streptomyces* 和 *Nocardopsis* 为优势属, 占分离菌株的 46.7%, 其次为 *Kocuria*、*Nonomuraea* 和 *Arthrobacter*, 其他的仅占 30.8%。

16S rRNA 基因序列相似性分析显示, 分离的 120 株菌与 22 个属的 66 个生效发表的种相似。以 16S rRNA 基因序列相似性 $\geq 98.0\%$ 作为同一个物种的标准, 其中有 4 个潜在的新种: 菌株 EGI 80314 与 *Streptomyces albus* subsp. *albus* NRRL B-2365^T (DQ026669) 相似性为 97.29%, 菌株 EGI 80050 与 *Streptomyces candidus* NRRL ISP-5141^T (DQ026663) 相似性为 96.73%, 为 *Streptomyces* 潜在新种; 菌株 EGI 80083 与 *Nonomuraea bangladeshensis* 5-10-10^T (AB274966) 相似性为 97.95%, 为 *Nonomuraea* 潜在新种; 菌株 EGI 80099 与 *Nesterenkonia aethiopica* DSM 17733^T (AY574575) 相似性为 97.3%, 为 *Nesterenkonia* 潜在新种。

2.2 分离菌株的生长 pH

采用液体缓冲液培养分离菌株, 以检测其生长 pH。参照 Yumoto 等对碱环境细菌的分类^[10], 所分离菌株分为两大类: ①耐碱放线菌: EGI 80002 和 EGI 80349 的 pH 生长范围为 6.0 - 10.0, 最适 pH 为 7.0 - 8.0; EGI 80012 和 EGI 80075 的 pH 生长范围和最适 pH 分别为 6.0 - 11.0、8.0 - 9.0; ②嗜碱放线菌: 其余 116 株的 pH 生长范围为 6.0 - 11.0 (12.0) 或 7.0 - 11.0 (12.0), 最适 pH 在 9.0 - 10.0 之间, 因此属兼性嗜碱放线菌; 未分离到在 pH 8.0 以下不生长的专性嗜碱放线菌。

2.3 培养基分离效果比较

3 种培养基的分离结果见表 3。改良 CCMS 培养基共分离到 84 株兼性嗜碱放线菌, 分布在 21 个属, 与 52 个模式菌株 16S rRNA 基因序列相似性最为相似; ISP5 培养基分离到 17 株菌, 分布在 10 个属, 与 14 个模式菌株 16S rRNA 基因序列相似性最为相似; 淀粉酪素琼脂分离到 15 株菌, 分布在 8 个属, 与 15 个模式菌株 16S rRNA 基因序列相似性最为相似。由上可知, 改良 CCMS 培养基分离得到的菌株和物种最多, 分离效果最好。

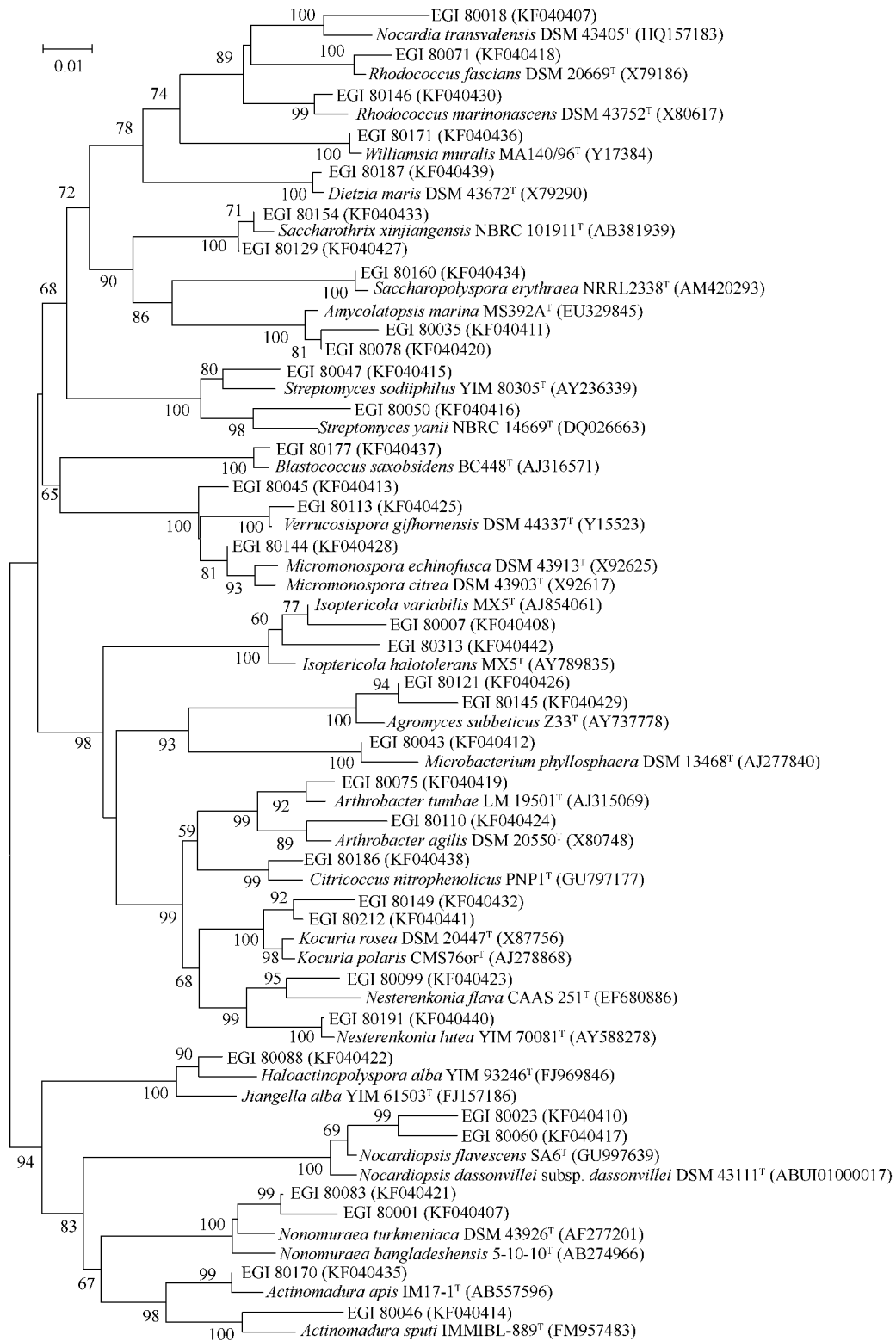


图 1. 基于 16S rRNA 基因部分序列构建的系统进化 N-J 树

Figure 1. Neighbour-joining phylogenetic tree based on partial 16S rRNA gene sequences of the representative isolates. Numbers at the nodes indicate that bootstrap values (> 50%) based on Neighbour-joining analysis of 1000 resampled data tests.

表 2. 分离菌株数及其种属分布

Table 2. Strain numbers and the taxonomic distribution

order	family	genus	strain number	species number	
<i>Streptomycetales</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	31	20	
<i>Streptosporangiales</i>	<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis</i>	25	7	
		<i>Nonomureae</i>	9	6	
	<i>Thermoactinomycetes</i>	<i>Actinomadura</i>	2	2	
		<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	6	4
<i>Micrococcales</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>	6	4	
		<i>Kocuria</i>	12	2	
		<i>Nesterenkonia</i>	4	4	
		<i>Citricoccus</i>	1	1	
		<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Agromyces</i>	2	1
		<i>Microbacterium</i>	1	1	
		<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Isoptericola</i>	5	3
	<i>Micromonosporales</i>	<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i>	5	3
			<i>Verrucosipora</i>	2	2
			<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Rhodococcus</i>
<i>Corynebacteriales</i>	<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	1	1	
		<i>Dietziaceae</i>	<i>Dietzia</i>	2	1
		<i>Williamsia</i>	1	1	
		<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Amycolatopsis</i>	2
<i>Pseudonocardiales</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Saccharopolyspora</i>	1	1	
		<i>Saccharothrix</i>	2	1	
		<i>Jiangellales</i>	<i>Jiangellaceae</i>	<i>Jiangella</i>	2
<i>Frankiales</i>	<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Blastococcus</i>	1	1	

表 3. 3 种培养基分离的兼性嗜碱放线菌菌株数及种属分布

Table 3. Strain number and distribution of facultative-alkaliphilic actinobacteria isolated with three media

isolation medium	genera and numbers of isolated strains
CCMS	<i>Streptomyces</i> (24), <i>Nonomurea</i> (6), <i>Nocardiopsis</i> (20), <i>Isoptericola</i> (4), <i>Nocardia</i> (1), <i>Amycolatopsis</i> (2), <i>Actinomadura</i> (1), <i>Jiangella</i> (2), <i>Arthrobacter</i> (2), <i>Dietzia</i> (1), <i>Agromyces</i> (1), <i>Saccharothrix</i> (2), <i>Saccharopolyspora</i> (1), <i>Williamsia</i> (1), <i>Blastococcus</i> (1), <i>Nesterenkonia</i> (1), <i>Kocuria</i> (8), <i>Micromonospora</i> (2), <i>Rhodococcus</i> (2), <i>Microbacterium</i> (1), <i>Verrucosipora</i> (1)
ISP5	<i>Streptomyces</i> (2), <i>Nonomurea</i> (1), <i>Dietzia</i> (1), <i>Agromyces</i> (1), <i>Rhodococcus</i> (1), <i>Citricoccus</i> (1), <i>Nesterenkonia</i> (3), <i>Kocuria</i> (4), <i>Micromonospora</i> (2), <i>Nocardiopsis</i> (1)
starch-casein	<i>Streptomyces</i> (3), <i>Nonomurea</i> (2), <i>Isoptericola</i> (1), <i>Actinomadura</i> (1), <i>Arthrobacter</i> (2), <i>Micromonospora</i> (1), <i>Verrucosipora</i> (1), <i>Nocardiopsis</i> (4)

此外, 土样采集点及周边环境会显著影响菌株的分离效果以及其物种丰度。样品 1 至 5 号采自阜康站周边地区, 人为干扰较小, 从中分离到 79 株菌 (分布于 19 个属)。而 6 至 10 号样品采自水库、农田灌水渠附近高盐碱生境, 人为影响较大, 相对分离效果较差。

2.4 酶活检测结果

以淀粉、脱脂牛奶、木聚糖和微晶纤维素为底物, 对 120 株菌进行产酶活性初筛。结果表明, 具有产淀粉酶、蛋白酶、木聚糖酶和纤维素酶活性的菌株比率分别为 35.8%、37.5%、28.3% 和 17.5%。其

中, 菌株 EGI 80009、EGI 80011、EGI 80324 具有较高的淀粉酶活性; 菌株 EGI 80008 蛋白酶活性较高, 其次为 EGI 80030、EGI 80043、EGI 80113、EGI 80313; 菌株 EGI 80129、EGI 80144、EGI 80240、EGI 80380 具有较高的纤维素酶活性。木聚糖酶活性普遍较低, 其水解圈半径大于 1.0 cm 的只有 EGI 80324。一些菌株可产 2 种或 3 种酶, 表 4 为部分代表菌株的鉴定信息和酶解情况。优势属 *Streptomyces* 菌株产生淀粉酶、蛋白酶、木聚糖酶和纤维素酶的阳性率分别为 53.0%、70.5%、64.7% 和 17.6%, *Nocardiopsis* 属菌株降解对应底物的比率分别为

11.7%、35.3%、47.0% 和 17.6%。*Nonomuraea* 属菌株产生木聚糖酶和纤维素酶的比率较高,均为 80.0%,而淀粉酶和蛋白酶比率较低;*Kocuria* 属菌株产生淀粉酶、蛋白酶、木聚糖酶酶活的比率分别为

66.7%、25.0%、41.7%,尚未检测到纤维素酶酶活;*Arthrobacter* 属菌株产生淀粉酶、蛋白酶和木聚糖酶酶活的比率分别为 33.3%、50.0%、33.3% 和 16.7%。

表 4. 部分代表菌株的鉴定信息及酶活筛选结果

Table 4. Characteristics and enzymatic screening of some representative strains

strain number	accession number	closest species	similarity /%	starch	skim milk	xylan	microcrystalline cellulase
EGI 80001	KF040407	<i>Nonomuraea kuesteri</i>	98.22	-	++	+	+++
EGI 80009	KF428897	<i>Streptomyces kurssanovii</i>	99.13	+++	+++	+	-
EGI 80011	KF428898	<i>Streptomyces setonii</i>	100	+++	+++	+	-
EGI 80030	KF428909	<i>Streptomyces setonii</i>	100	++	+++	+	-
EGI 80129	KF040427	<i>Saccharothrix xinjiangensis</i>	99.67	++	-	-	+++
EGI 80145	KF040429	<i>Agromyces subbeticus</i>	98.26	++	+++	-	-
EGI 80240	KF428957	<i>Isoptericola halotolerans</i>	99.45	++	+	-	+++
EGI 80311	KF428963	<i>Streptomyces fimbriatus</i>	96.75	+	+++	-	+++
EGI 80313	KF040442	<i>Isoptericola halotolerans</i>	98.22	+	+++	-	++
EGI 80324	KF428966	<i>Nocardiopsis sinuspersici</i>	99.01	+++	-	++	-
EGI 80380	KF428977	<i>Nocardiopsis synnemataformans</i>	98.81	-	+++	-	+++

-, negative; +, positive, zones of hydrolysis ≤ 1.0 cm; ++, the higher positive, 1.0 cm < zones of hydrolysis ≤ 2.0 cm;

+++ , the highest positive, 2.0 cm < zones of hydrolysis. Zones were measured from edge of colony to edge of clearing.

3 讨论

嗜碱放线菌作为一个潜在的获得天然活性物质、抗生素的重要来源^[1-5],近年来备受微生物学者们的关注。由于我们对嗜碱放线菌生理学、营养代谢特性等知之甚少,只能借鉴嗜碱菌或普通放线菌的分离方法对其进行分离,所采用的分离培养基或条件在一定程度上会对一些种属产生选择性。Horikoshi-I、Horikoshi-II 是分离嗜碱菌的经典培养基^[6],其组分 Na_2CO_3 会抑制一些 *Streptomyces* 菌株生长,但对 *Nocardiopsis* 菌株生长没有影响^[17]。迪丽拜尔·托乎提用高氏一号培养基对罗布泊外围高盐碱环境嗜碱放线菌进行了分离,测定序列的 47 株菌中 70% 为 *Streptomyces* 属菌株^[8]。姜怡等采用 Horikoshi-I 及其他 3 种培养基从新疆、青海等地区盐碱地样品分离到 534 株菌, *Streptomyces* 和 *Nocardiopsis* 为优势菌群^[9]。因此,如何减弱或消除高盐碱环境中优势菌 *Streptomyces* 和 *Nocardiopsis* 的影响,分离到尽可能多的新物种新菌株是当前嗜碱放线菌研究的关键所在。本研究采用改良的嗜盐放线菌分离培养基 CCMS^[10],和常规的经典培养基 ISP5 和淀粉酪素琼脂,从阜康盐碱地的 10 份样品中共分离到 116 株兼性嗜碱放线菌和 4 株耐碱放线

菌,其中为非优势 *Streptomyces* 和 *Nocardiopsis* 属菌株占 53.3%。改良 CCMS 培养基共分离到 84 株菌(分布于 21 个属),表明改良 CCMS 培养基较适合于兼性嗜碱放线菌的分离。可能的原因是自然界中嗜盐放线菌和兼性嗜碱放线菌生存的环境相似,高盐碱环境中盐与碱的形成是一个双向化学过程,因此改良 CCMS 培养基能分离到种类较多的兼性嗜碱放线菌。对兼性嗜碱放线菌而言,碱性 pH 是影响其生存的关键因素。本实验也考察了 NaOH 和 Na_2CO_3 对兼性嗜碱放线菌分离效率的影响(结果未给出),其中用 NaOH 调节 pH 的培养基分离到的菌株占 78%, Na_2CO_3 调节 pH 的培养基分离到的菌株占 22%,表明 pH 调节物质对兼性嗜碱放线菌的分离有一定的影响。盐浓度、复合盐及温度是影响高盐环境嗜盐放线菌分离的关键因素^[18]。后续研究中,我们将从样品预处理、盐浓度、温度等因素入手,优化兼性嗜碱放线菌的分离方案,突破兼性嗜碱放线菌物种资源获得的瓶颈。

本实验中,所分离菌株分布在放线菌纲的 8 个目 13 个科 22 个属,表明阜康盐碱地生境富含丰富的兼性嗜碱放线菌物种资源。其中, *Williamsia* 和 *Verrucosispora* 均是首次在盐碱地环境中分离到的。发现潜在新种 4 个:菌株 EGI 80050、EGI 80314 为 *Streptomyces* 潜在新种; 菌株 EGI 80083 为

Nonomuraea 潜在新种, 菌株 EGI 80099 为 *Nesterenkonia* 潜在新种。分离菌株产生的淀粉酶、蛋白酶、木聚糖酶和纤维素酶的比率分别为 35.8%、37.5%、28.3%、17.5%; 少数菌株具有较高的酶活性, 极个别菌株可产两种以上酶活。综上可知, 兼性嗜碱放线菌是一个获得酶的潜在来源。

本实验利用纯培养方法对阜康盐碱地环境兼性嗜碱放线菌的多样性进行探讨, 从中发现大量非优势菌群, 兼性嗜碱放线菌具有产生高活性酶的潜力, 这些结果说明阜康盐碱地生境中蕴藏丰富的兼性嗜碱放线菌资源有待于进一步的挖掘与开发。

参考文献

- [1] Li YQ, Li MG, Li W, Zhao JY, Ding ZG, Cui XL, Wen ML. Griseusin D, a new pyranonaphthoquinone derivative from an alkaphilic *Nocardiopsis* sp.. *The Journal of Antibiotics*, 2007, 60(12): 757-761.
- [2] He J, Roemer E, Lange C, Huang XS, Maier A, Kelter G, Jiang Y, Xu LH, Menzel KD, Grabley S, Fiebig HH, Jiang CL, Sattler I. Structure, derivatization, and antitumor activity of new Griseusins from *Nocardiopsis* sp.. *Journal of Medical Chemistry*, 2007, 50 (21): 5168-5175.
- [3] Ding ZG, Li MG, Zhao JY, Ren J, Huang R, Xie MJ, Cui XL, Zhu HJ, Wen ML. Naphthospirozone A: an unprecedented and highly functionalized polycyclic metabolite from an alkaline mine waste extremophile. *Chemistry-A European Journal*, 2010, 16 (13): 3902-3905.
- [4] Dietera A, Hamm A, Fiedler H P, Goodfellow M, Muller WE, Brun R, Bringmann G. Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced by a novel alkaliphilic *Streptomyces* strain. *The Journal of Antibiotics*, 2003, 56(7): 639-646.
- [5] Wang ZY, Fu P, Liu P P, Wang P, Hou J, Li WJ, Zhu W. New pyran-2-ones from alkaliphilic actinomycete, *Nocardiopsis alkaliphila* sp. nov. YIM-80379. *Chemistry & Biodiversity*, 2013, 10(2): 281-287.
- [6] Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999, 63(4): 735-750.
- [7] Sarethy IP, Saxena Y, Kapoor A, Sharma M, Sharma SK, Gupta V, Gupta S. Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2011, 38(7): 769-790.
- [8] Tothy D, Habdin X, Chen J, Zhu Y, Hasanjan, An D, Zhou Y. Biological characteristics and active substances of alkaliphilic actinomycetes from extreme environment of Lop Nur peripherals in Xinjiang, China. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2009, 15(6): 835-839. (in Chinese)
迪丽拜尔·托乎提, 旭格拉·哈布丁, 陈瑾, 朱艳蕾, 艾山江, 安登第, 周宇光. 新疆罗布泊外围地区极端环境嗜碱放线菌生物学特性及活性物质筛选. 应用与环境生物学报, 2009, 15(6): 835-839.
- [9] Jiang Y, Li W, Xu P, Tang S, Xu L, Zhang Y, Zhang Y, Zhang L. Study on diversity of actinomycetes under salt and alkaline environments. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(2): 191-195. (in Chinese)
姜怡, 李文均, 徐平, 唐蜀昆, 徐丽华, 张玉琴, 张永光, 张利平. 盐碱环境放线菌多样性研究. 微生物学报, 2006, 46(2): 191-195.
- [10] Yumoto I, Hirota K, Yoshimune K. Environmental distribution and taxonomic diversity of alkaliphiles // Horikoshi K, Antranikian G, Bull AT, Robb FT, Stetter KO. *Extremophiles Handbook*. Berlin: Springer, 2011.
- [11] Tang SK, Tian XP, Zhi XY, Cai M, Wu JY, Yang LL, Xu LH, Li WJ. *Haloactinospora alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete of the family *Nocardiopsaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(9): 2075-2080.
- [12] Xu P, Li W, Xu L, Jiang C. A microwave-based method for genomic DNA extraction from Actinomycetes. *Microbiology China*, 2003, 30(4): 82-84. (in Chinese)
徐平, 李文均, 徐丽华, 姜成林. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84.
- [13] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [16] Li WJ, Zhang YG, Zhang YQ, Tang SK, Xu P, Xu LH,

Jiang CL. *Streptomyces sodiiphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(3): 1329-1333.

[17] Zhang Y, Tang S, Li W, Xu L, Jiang C. Preliminary studies on physiological characteristics of alkaliphilic actinomycetes. *Microbiology China*, 2004, 31(1): 30-35. (in Chinese)

张永光, 唐蜀昆, 李文均, 徐丽华, 姜成林. 嗜碱放线

菌生理学特性的初步研究. *微生物学通报*, 2004, 31(1): 30-35.

[18] Tang S, Jiang Y, Zhi X, Lou K, Li W, Xu L. Isolation methods of halophilic actinomycetes. *Microbiology China*, 2007, 34(2): 390-392. (in Chinese)

唐蜀昆, 姜怡, 职晓阳, 楼恺, 李文均, 徐丽华. 嗜盐放线菌分离方法. *微生物学通报*, 2007, 34(2): 390-392.

Biodiversity and enzymes of culturable facultative-alkaliphilic actinobacteria in saline-alkaline soil in Fukang, Xinjiang

Yongguang Zhang¹, Qing Liu², Hongfei Wang¹, Daofeng Zhang¹, Jiyue Chen¹, Yuanming Zhang¹, Wenjun Li^{1, 2*}

¹Key Laboratory of Biogeography and Bioresource in Arid Land, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

²Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan Province, China

Abstract: [Objective] In order to analyze the biodiversity of cultivable facultative-alkaliphilic actinobacteria and the enzymes they produced. [Methods] Total 10 soil samples were collected from saline-alkaline environments of Fukang, Xinjiang province. Facultative-alkaliphilic actinobacteria strains were isolated and identified by 16S rRNA gene sequence analysis. Enzymes including amylase, proteinase, xylanase, and cellulase were detected. [Results] Total 116 facultative-alkaliphilic actinobacterial strains and 4 alkali-tolerant actinobacterial strains were isolated from the samples, and those strains were distributed within 22 genera in 13 families and 8 orders of actinobacteria based on their 16S rRNA gene sequence analysis. The ratio of non-predominant *Streptomyces* and *Nocardiopsis* strains were 53.3%. The positive rates of amylase, proteinase, xylanase and cellulase were 35.8, 37.6, 28.3 and 17.5%, respectively. [Conclusion] Diverse facultative-alkaliphilic actinobacteria were discovered from saline-alkaline environments of Fukang. Facultative-alkaliphilic actinobacteria are a potential source for enzymes. The study would facilitate the knowledge of the diversity of facultative-alkaliphilic actinobacteria, and provide the technical basis for exploration of facultative-alkaliphilic actinobacteria resources.

Keywords: saline alkali land, facultative-alkaliphilic actinobacteria, diversity, enzymes

(本文责编:张晓丽)