

嗜酸丝状放线菌的选择性分离与多样性

丁芸^{1,2}, 黄英^{1*}, 阮继生¹, 高勇生²

(¹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)

(²江西农业大学国土资源与环境学院, 南昌 330045)

摘要:【目的】针对酸性土壤中的嗜酸丝状放线菌, 建立有效的选择性分离方法, 并了解其多样性。【方法】用不同的样品预处理方式和分离培养基, 并添加不同的抑制剂进行分离; 根据放线菌的菌落数和出菌率确定最佳分离方法组合。采用最佳分离方法对从江西采集的 17 份酸性土壤样品进行分离; 根据培养特征对分离菌株进行分群, 进一步通过对各类群的显微形态观察和 pH 梯度生长实验确定代表菌株; 对代表菌株进行 16S rRNA 基因序列分析研究其多样性。【结果】嗜酸丝状放线菌的最佳分离方法为: 土壤样品经分散差速离心预处理后, 涂布添加了放线菌酮、制霉菌素和萘啶酮酸(各 50 mg/L)的 GTV 培养基。用此方法共分离到放线菌 369 株, 归为 10 个不同的颜色类群, 其中 6.6% 为严格嗜酸放线菌, 72.4% 为中度嗜酸放线菌, 21.0% 为耐酸放线菌。52 株嗜酸放线菌代表菌株分布于放线菌目中的 12 个属: 链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、野野村菌属(*Nonomuraea*)、韩国生工属(*Kribbella*)、小双孢菌属(*Microbispora*)、马杜拉菌属(*Actinomadura*)、拟无枝菌酸菌属(*Amycolatopsis*)、指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)、伦茨氏菌属(*Lentzea*)、游动四孢菌属(*Planotetraspora*)和链嗜酸菌属(*Streptacidiphilus*), 其中链霉菌分离菌株在系统发育树上形成 12 个不同的进化类群。【结论】所建立的选择性分离方法可用于土壤嗜酸丝状放线菌的高效分离; 江西酸性土壤含有丰富多样的嗜酸丝状放线菌种属。

关键词: 嗜酸放线菌; 丝状放线菌; 选择性分离; 多样性; 土壤

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0710-08

嗜酸放线菌广泛分布于酸性土壤中, 在土壤有机物的降解循环及真菌拮抗中起着重要作用。放线菌中, 次生代谢产物的多产菌大都呈丝状生长^[1], 因此嗜酸丝状放线菌的研究对寻找和发现新的抗真菌活性物质具有重要意义。

已有的研究结果表明^[2-4], 嗜酸放线菌可分为两大类群, 即中度嗜酸(Neutrotolerant acidophilic)和严格嗜酸(Strictly acidophilic)放线菌。中度嗜酸放线菌可在 pH 3.5 或 4.5 至中性生长, 而严格嗜酸放线菌的生长 pH 范围为 3.5 ~ 6.5, 且利用碳源的能

力普遍比中度嗜酸放线菌强; 它们的最适生长 pH 范围均为 4.5 ~ 5.5。

Williams 等^[5]曾于 1971 年报道他们从两份酸性土壤中分离到数株具有链霉菌形态特征的嗜酸放线菌。2003 年 Kim 等^[6]对 3 株有链霉菌形态特征的严格嗜酸放线菌进行了多相分类研究, 发现它们在系统进化树上形成与链霉菌属平行, 但独立于链霉菌属之外的单独分枝, 由此建立了链嗜酸菌新属(*Streptacidiphilus* gen. nov.)。随后, 我们实验室和英国 Goodfellow 教授实验室也从酸性土壤中分离到严

基金项目: 国家自然科学基金(30770002); 国家“973 项目”(2004CB719601)

* 通信作者。Tel/ Fax: +86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn

作者简介: 丁芸(1984-), 女, 江西吉安人, 硕士研究生, 主要从事放线菌系统学研究。

收稿日期: 2009-03-02; 修回日期: 2009-03-25

格嗜酸的、具有链霉菌形态的菌株,并描述了两个链嗜酸菌新种^[7-8]。近来,意大利和日本科学家又从森林土壤中分离到属于纤细链孢菌新亚目(*Catenulisporinae*)的嗜酸放线菌类群^[9-11]。

新的嗜酸放线菌被多国研究者陆续发现的事实表明,人们以往对自然环境中嗜酸放线菌多样性的认识还远远不够。新的放线菌类群意味着可能带来新的次生代谢产物,而这些菌株的获得依赖于有效的分离方法。澳大利亚 Janssen 教授实验室用贫营养的酸性培养基从当地牧场土壤中分离到若干新的嗜酸放线菌^[12-13];他们的研究^[14]还指出,用固体培养

基比液体稀释培养能更有效地从土壤中分离出多样性的菌株。我国南方江西等地分布着大量的红壤,这类土壤的特点是酸、瘦、粘、旱,是嗜酸放线菌的适宜栖息地。本研究以这类土壤为材料设计了嗜酸丝状放线菌的选择性分离方法,并通过表观形态和 16S rRNA 基因序列分析研究了分离菌株的多样性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品:样品来源及性质见表 1。

表 1 土壤来源和酸度

Table 1 The source, vegetation plant and acidity of soil samples

Number	Location	Vegetation	pH
1	Yaoli forest, Jingdezhen county, Jiangxi Province	<i>Sassafras</i>	5.0
2	Yaoli forest, Jingdezhen county, Jiangxi Province	<i>Alniphyllum fortunei</i>	5.0
3	Yaoli forest, Jingdezhen county, Jiangxi Province	Couch grass	5.0
4	Yaoli forest, Jingdezhen county, Jiangxi Province	<i>Rhododendron ovatum</i>	5.0
5	The foot of Wushan copper mine, Ruichang city, Jiangxi Province	Couch grass	3.5
6	The foot of Wushan copper mine, Ruichang city, Jiangxi Province	No plants	3.5
7	The eastern region of Jiangxi Agricultural University	<i>Osmanthus</i>	5.0
8	The eastern region of Jiangxi Agricultural University	Tea plants	5.0
9	The eastern region of Jiangxi Agricultural University	<i>Camellia oleifera</i>	5.0
10	The eastern region of Jiangxi Agricultural University	<i>Cinnamomum camphora</i>	5.0
11	The eastern region of Jiangxi Agricultural University	Aculeate tree	5.0
12	The western region of Jiangxi Agricultural University	<i>Cinnamomum camphora</i>	5.0
13	The western region of Jiangxi Agricultural University	<i>Osmanthus fragrans</i>	5.0
14	The western region of Jiangxi Agricultural University	Fir tree	5.0
15	Xiangshan, Nanchang city, Jiangxi Province	No plants	5.0
16	Xiangshan, Nanchang city, Jiangxi Province	Couch grass	5.0
17	Poyang Lakeside, Jiangxi Province	Couch grass	5.0

1.1.2 选择性分离培养基:① HV 培养基^[15], pH 5.0;② GTV 培养基^[9];③ ISP9 + xyl 培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.64 g, K_2HPO_4 5.56 g, KH_2PO_4 2.38 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.4 mg, 微量盐溶液 1.0 mL, 琼脂 20 g, 木糖(xylose) 10 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 5.0;④ C 培养基: D-蔗糖 10 g, L-谷氨酸 1.0 g, L-天冬氨酸 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CaCO_3 0.02 g, K_2HPO_4 2 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 5.0;⑤ GYM 培养基: 酵母提取物 4.0 g, 葡萄糖 4.0 g, 麦芽糖 10.0 g, CaCO_3 2.0 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 5.0。

1.1.3 主要试剂和仪器:放线菌酮(Cycloheximide, CY)、制霉菌素(Nystatin, NY)和萘啶酮酸(Nalidixic Acid, NA)均购自北京 TIANGEN 公司;PCR 试剂和引物购自上海 Sangon 公司;其余试剂均为国产或进口分析纯。PCR 仪器为美国 Bio-rad 公司产品;显微镜

为德国 Zeiss 公司产品。

1.2 嗜酸丝状放线菌的选择性分离

1.2.1 样品预处理:风干的土壤样品挑去树枝、石块等杂物后于无菌研钵中研成粉末状,然后采用下述不同方法进行样品处理:① 常规稀释法;② 分散和差速离心法(Dispersion and differential centrifugation, DDC)^[16];③ 110℃干热处理 1 h^[15];④ 55℃干热处理 1 h^[17]。

1.2.2 选择性分离方法:① 确定分离培养基:土壤样品经常规稀释处理,取 10^{-3} 稀释度的悬液 200 μL 分别涂布于添加 50 mg/L NY + 50 mg/L CY + 50 mg/L NA 抑制剂的 HV、GTV、ISP9 + xyl、C 和 GYM 5 种培养基平板上。28℃培养 4~6 周后,计算各培养基平板放线菌的菌落数和出菌率,确定最佳培养基。② 确定预处理方法:土壤样品分别经过上述 4 种方法预处理后,稀释成 10^{-3} 悬液,取 200 μL 涂布到①中

确定的最佳培养基平板上, 28℃培养 4~6 周后, 根据各平板放线菌的菌落数和出菌率确定最佳预处理方法。③ 确定抑制剂组合: 土壤样品经②中确定的最佳预处理方法处理后, 稀释成 10^{-3} 悬液, 取 200 μ L 涂布到添加以下抑制剂的最佳培养基上: 50 mg/L CY + 50 mg/L NY; 50 mg/L CY + 50 mg/L NY + 50 mg/L NA; 重铬酸钾 ($K_2Cr_2O_7$) 150 mg/L; 50 mg/L CY + $K_2Cr_2O_7$ 150 mg/L。28℃培养 4~6 周后, 根据放线菌的菌落数和出菌率确定最适合的抑制剂组合。

将所得的单菌落挑至 pH 5.0 的 GYM 培养基进行纯化; 纯培养物的孢子或菌丝体置于 20% 的甘油中, -20℃ 保藏。

1.3 pH 梯度生长试验

用 pH 3.5~7.5 的缓冲液配制的 GYM 培养基, 参照文献[7]所述方法进行。根据菌落大小, 基丝、气丝及孢子丝的丰茂程度判断菌株的生长状况。肉眼可见菌落, 但菌落很小或菌丝稀少的为弱生长; 无肉眼可见菌落的为不生长。

1.4 形态特征的观察

用 pH 5.0 的 GYM 培养基, 肉眼观察气丝、基丝和色素颜色, 插片法显微镜观察菌丝形态。

1.5 16S rRNA 基因的扩增、测序和序列分析

在平板或斜面上收集新鲜菌体, 参照 Chun^[18] 方法进行总 DNA 的小量提取和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增, 扩增和测序引物为通用引物 27f 和 1492r^[19]。测序工作由北京农科院完成。将所测序列与 GenBank 数据库中的已有序列进行 BLAST 比对, 并从数据库获得相关种的 16S rRNA 基因序列, 导入 MEGA^[20] 软件中进行系统发育分析。首先用 Clustal W 进行多序列比对, 然后按照 Kimura 2-parameter 计算进化距离^[21], 最后构建 Neighbour-Joining (NJ) 系统发育树, Bootstrap 分析的重复次数为 1000。

2 结果

2.1 选择性分离方法

为了确定最佳的选择性分离方法, 我们采用方法中的 4 种预处理方式和 5 种培养基, 选择添加 4 种抑制剂, 对 3 份土壤样品进行了详细地分离。

从分离得到的放线菌菌落数及出菌率来看, ISP9 + xyl、C 和 GYM 这 3 种培养基上的放线菌菌落稀少、出菌率低, 都不是适宜的分离培养基; 而 HV 和 GTV 这 2 种培养基上的放线菌菌落数及出菌率优势明显, 其中 HV 培养基上的放线菌菌落数为 GYM 培养基的 1.25 倍, GTV 培养基上的放线菌菌

落为 GYM 培养基的 4.1 倍, 其细菌和真菌的菌落数均明显少于 GYM 培养基(图 1-A), 故确定 GTV 为最佳分离培养基。从图 1-B 可以看出, 用分散差速离心法 (DDC) 对样品进行预处理的分离平板上细菌和真菌污染少, 放线菌菌落丰富, 出菌率达到 91.6%, 可作为分离嗜酸放线菌的适宜手段; 而经过其它 3 种方法预处理的样品所得到的放线菌的菌落数和出菌率都明显低于 DDC 方法。从图 1-C 可以看出, 使放线菌菌落数和出菌率达到最高的最佳抑制剂组合为放线菌酮 (CY) 50 mg/L + 制霉菌素 (NY) 50 mg/L + 萘啶酮酸 (NA) 50 mg/L。

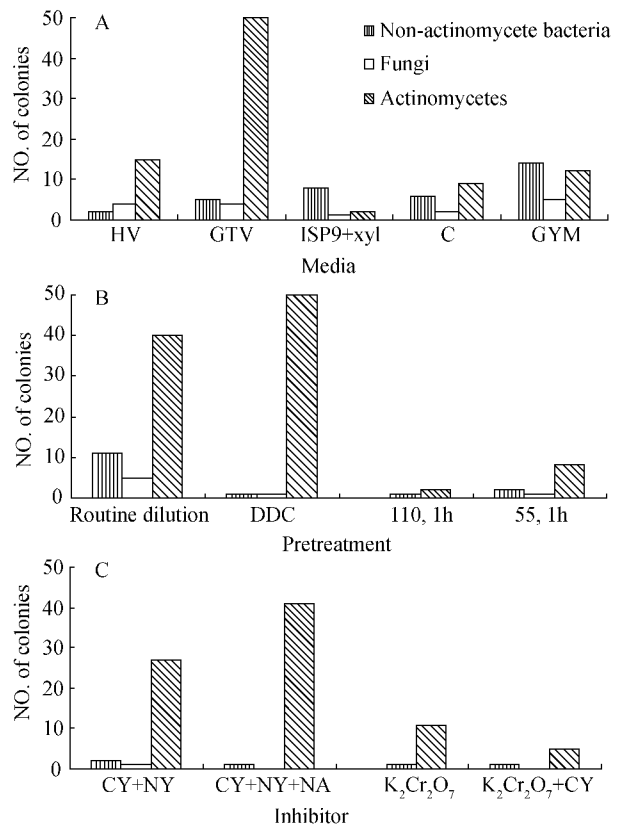


图 1 不同选择性分离组合所得的平板细菌、真菌和放线菌的菌落数

Fig. 1 Average numbers of colonies ($\times 10^4$ CFU/g dry weight composite soil) recorded on different selective plates (A, C) or after different pretreatments (B). A: Routine pretreatment and media with CY + NY + NA; B: GTV medium with CY + NY + NA; C: GTV medium and pretreatment with DDC.

2.2 分离菌株的表现分群

通过 DDC 进行样品预处理, 用添加了 CY 50 mg/L + NY 50 mg/L + NA 50 mg/L 的 GTV 培养基, 从 17 份土壤样品中共分离得到放线菌 369 株。它们的形态特征丰富多样, 根据基丝、气丝和可溶性色素的特征将分离菌株归为 10 个不同的类群; 白孢类

群、淡紫灰类群、粉红孢类群、黄色类群、灰褐类群、金色类群、烬灰类群、绿色类群、吸水类群、粉红紫类群。从各类群中挑取代表菌株共 76 株,显微镜形态观察表明,其中 55 株基内菌丝分枝发达、无横隔、不断裂,具有柔曲或螺旋的气生孢子链,与链霉菌形态特征相似;另外 21 株或基丝断裂,或产生单、双孢子,或形成孢囊,无孢子链,与链霉菌形态明显不同。

2.3 pH 梯度生长范围

76 株代表菌株在不同 pH 的 GYM 培养基上 28℃ 培养 3 周后,有 16 株菌在 pH 7.5 生长旺盛,而在 pH 4.5~5.5 生长稍弱,在 pH 3.5 不生长,它们为耐酸放线菌;有 5 株菌在 pH 7.5 不生长,而在 pH 3.5 明显生长,最适 pH 为 4.5,为严格嗜酸放线菌;其余有 40 株在 pH 7.5 生长,在 pH 3.5 也生长,有 15 株在 pH 7.5 不生长或弱生长,在 pH 3.5 也不生长,但均在 pH 5.0~5.5 生长最好,归为中度嗜酸放线菌。根据 pH 梯度生长范围和形态特征,进一步确定了 52 株嗜酸放线菌代表菌株。

2.4 16S rRNA 基因序列分析

将实验菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行比对,结果表明挑选的 52 代表菌株中,30 株为链霉菌,22 株为稀有放线菌。

2.4.1 嗜酸链霉菌的 16S rRNA 基因序列分析:图 2 显示了 30 株链霉菌及相关已知链霉菌的 16S rRNA 基因系统发育分析结果。根据 16S rRNA 基因的相

似性与系统发育关系,本研究中的 30 株嗜酸链霉菌代表菌株共构成 12 个距离较远的进化分枝,代表 12 个不同的进化类群:(1) 菌株 FXJ1.255、1.257、1.215、1.164、1.167、1.190、1.332、1.227 代表群 I,分别来自颜色类群的黄色类群和白色类群;(2) 菌株 FXJ1.297、1.298 代表群 II,均来自白色类群;(3) 菌株 FXJ1.195、1.136、1.169、1.198 代表群 VII,来自白色类群和灰褐类群;(4) 菌株 FXJ1.076、1.265、1.088、1.264 代表群 IX,均来自烬灰类群;(5) 菌株 FXJ1.116、1.259、1.067 代表群 X,均来自白色类群;(6) 菌株 FXJ1.066、1.124、1.069 代表群 X II,均来自烬灰类群;(7) 菌株 FXJ1.193、1.130、1.052、1.021、1.338、1.139 分别形成单独的进化枝,各自代表群 III、IV、V、VI、VIII、XI。

2.4.2 嗜酸稀有放线菌的 16S rRNA 基因序列分析:16S rRNA 基因序列分析表明,22 株稀有放线菌分布于放线菌目中的 11 个属(表 2),分属于 3 个科。其中小单孢菌属(*Micromonospora*)为优势种群,共 6 株代表菌株。菌株 FXJ1.144、FXJ1.102、FXJ1.166、FXJ1.179、FXJ1.034、FXJ1.177 和 FXJ1.271 与它们最相近的已知种的 16S rRNA 基因序列相似性低于 99%,有可能是未知的新种。图 3 显示了其中 FXJ1.102、FXJ1.177、FXJ1.179 分别与最相近的已知菌的 16S rRNA 基因系统发育分类关系。

表 2 根据 16S rRNA 基因序列分析所得的 22 株稀有放线菌的分类从属关系

Table 2 Phylogenetic affiliations of 22 rare actinomycetes based on comparative analysis of their 16S rRNA gene sequences

The strain No. of representatives	The number of representatives	Genus	The closest species	Identities of 16S rRNA gene sequences/%
FXJ1.144, FXJ1.178, FXJ1.262, FXJ1.347, FXJ1.349, FXJ1.353	6	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i> , <i>Micromonospora echinofusca</i> , <i>Micromonospora chersina</i> , <i>Micromonospora auratinigra</i> , <i>Micromonospora olivasterospora</i>	98.2~99.6
FXJ1.143, FXJ1.258, FXJ1.334	3	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia nova</i>	99.2~99.6
FXJ1.102, FXJ1.266, FXJ1.267	3	<i>Nonomuraea</i>	<i>Nonomuraea kuesteri</i> , <i>Nonomuraea bangladeshensis</i>	98.5~99.9
FXJ1.166, FXJ1.292	2	<i>Kribbella</i>	<i>Kribbella aluminosa</i>	98.5~99.3
FXJ1.343, FXJ1.350	2	<i>Microbispora</i>	<i>Microbispora rosea</i> , <i>Microbispora corallina</i>	99.2~99.3
FXJ1.340	1	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinomadura maheshkhaliensis</i>	99.5
FXJ1.302	1	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i>	99.2
FXJ1.179	1	<i>Dactyloporangium</i>	<i>Dactyloporangium fulvum</i>	98.9
FXJ1.034	1	<i>Lentzea</i>	<i>Lentzea violacea</i>	98.6
FXJ1.177	1	<i>Planotetraspora</i>	<i>Planotetraspora silvatica</i>	98.8
FXJ1.271	1	<i>Streptacidiphilus</i>	<i>Streptacidiphilus jiangxiensis</i>	98.8

3 讨论

通过对我国南方江西红壤中嗜酸放线菌的

分离,得到分离嗜酸丝状放线菌的最佳方法,主要涉及对样品进行 DDC 预处理,用添加放线菌酮(50 mg/L)、制霉菌素(50 mg/L)和萘啶酮酸(50 mg/L)

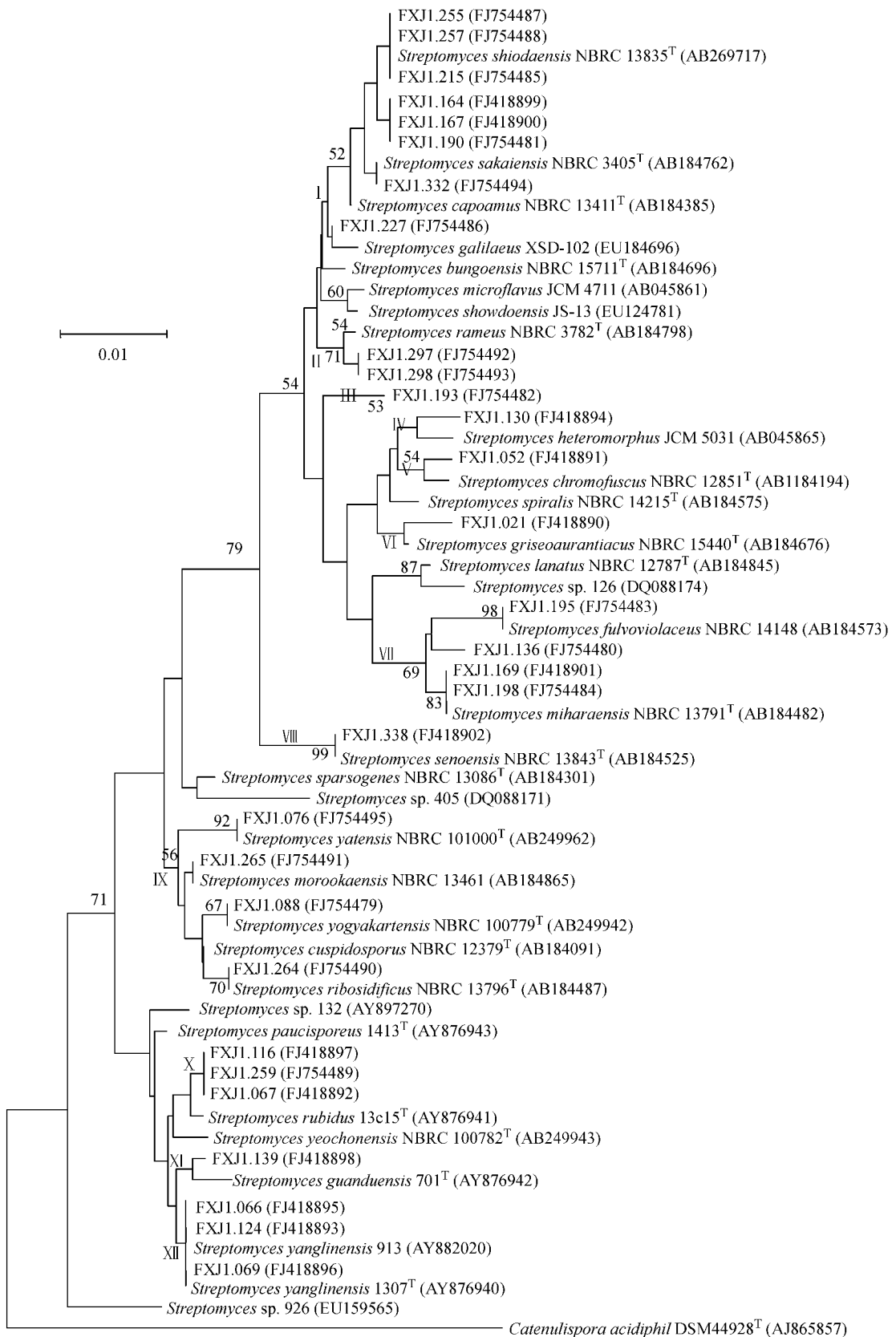


图2 代表性链霉菌分离菌株及相关链霉菌的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig.2 Neighbour-joining tree based on almost complete 16S rRNA gene sequences showing the taxonomic positions of representative streptomycete isolates. Numbers in parentheses represent the GenBank sequence accession numbers. Numbers at nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resampled data sets; only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position.

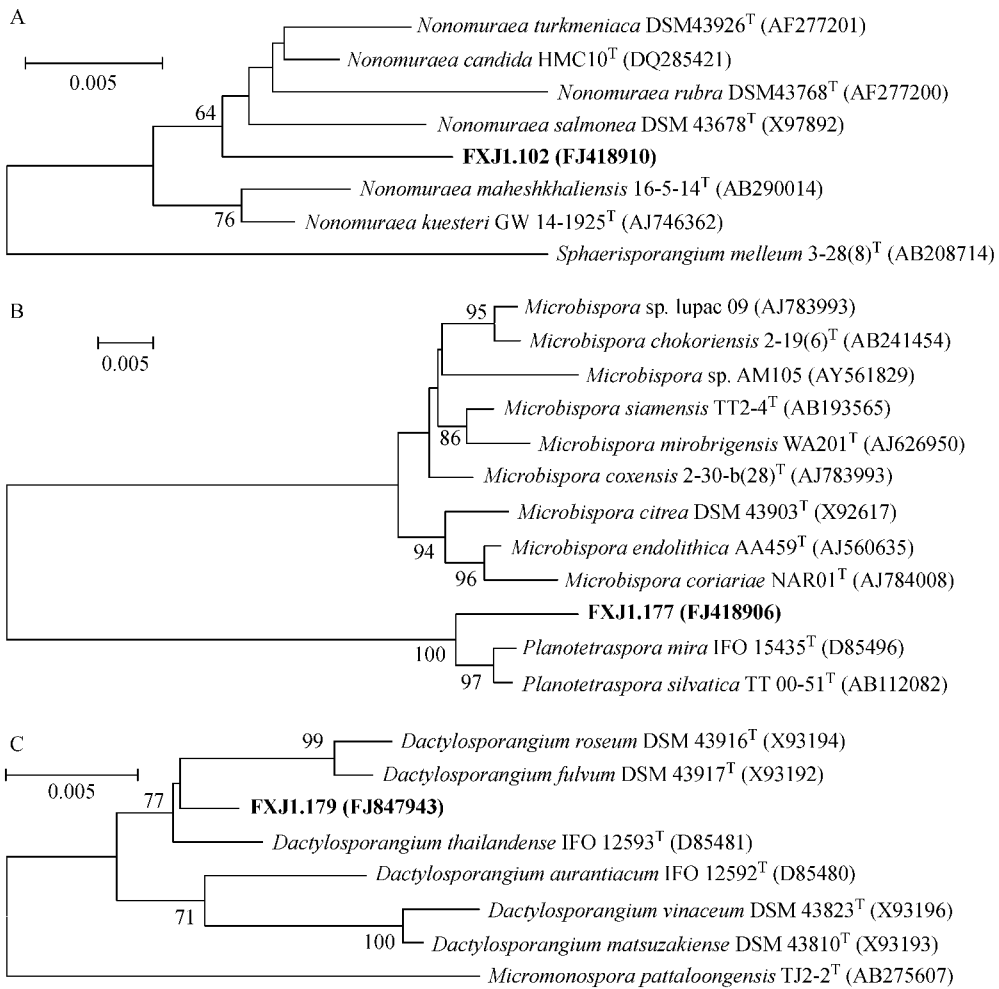


图3 代表菌株 FXJ1.102(A)、FXJ1.177(B)和 FXJ1.179(C)及相关已知稀有放线菌的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig.3 Neighbour-joining tree based on almost complete 16S rRNA gene sequences showing the taxonomic positions of representative isolates FXJ1.102 (A), FXJ1.177 (B) and FXJ1.179 (C). Numbers in parentheses represent the GenBank sequence accession numbers. Numbers at nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resampled data sets; only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.005 substitutions per nucleotide position.

的 GTV 琼脂进行分离培养。DDC 这一方法综合运用物理和化学手段,如混合振荡、温和超声波处理、化学震惊等,不同程度地破坏土壤团粒的聚集,使微生物释放出来,通过细度分选和分步收集、接种,将土壤中混生着的微生物有效的分离开来^[16]; GTV 培养基含有土壤浸汁和多种维生素,但碳、氮源浓度很低,自然 pH 值约为 5,更接近酸性土壤的原始环境,有利于放线菌的生长;此外,添加放线菌酮、制霉菌素和萘啶酮酸有效地抑制了真菌和其它细菌的生长。此分离组合的放线菌出菌率达到 90% 以上,放线菌的得率为传统方法(常规稀释, HV 或 GYM 培养基)的 3~4 倍以上,为分离嗜酸放线菌的适宜手段。

表观形态、pH 梯度生长实验和 16S rRNA 基因序列分析的结果充分表明,江西酸性土壤中存在丰富多样的嗜酸放线菌。与前人发表的有关嗜酸放

线菌多样性研究的结果比较,本研究获得的 12 个嗜酸链霉菌进化群包括了徐春光等的论文^[22]中 8 个中度嗜酸链霉菌类群中的 3 个,即群 X、XI 和 XII 所含的菌株 *S. rubidus* 13c15^T、*S. guanduensis* 701^T 和 *S. yanglinensis* 1307^T; 也包括了 Cho 等论文^[23]中的 cluster 6 (群 VII) 和 cluster 7 (群 X); 而本研究获得的群 I-VI、VIII 和 IX 8 个类群为与前人研究不同的新的嗜酸链霉菌类群。说明嗜酸链霉菌中有些类群是广泛分布的,如本文的群 X-XIII, 它们均与第一个发表的中度嗜酸链霉菌 *S. yeochonensis*^[3] 聚在一个大的进化分枝上,这个进化分枝代表了一个重要的中度嗜酸链霉菌大类群,涵盖了多个种,在韩国、中国云南、江西等地均有分布。而有些类群可能具有一定的生物地理学分布,如本文中与前人研究所不同的群 I-VI, 其中进化群 I 来自于鄱阳湖和瑶里两地的土壤,进化群 II 来自于鄱阳湖的土壤,进化群 III、IV

分别来自武山和江西农大校园。嗜酸链霉菌类群存在一定的生物地理学分布的现象在 Cho 等的论文^[23]中亦有报道。

本研究获得的 22 株嗜酸稀有放线菌分属于 11 个属,多样性远高于前人^[23-24]的报到。崔庆峰等^[24]只获得了 6 个属,其中仅 3 个属为丝状放线菌;Cho 等^[23]虽只是分离生孢放线菌,但他们只获得了链霉菌科 1 个科,链嗜酸菌属 (*Streptacidiphilus*) 1 个稀有菌属。本研究发现的嗜酸稀有放线菌优势菌群为小单孢菌属,也不同于崔庆峰等^[24]的报到。另外,虽然还有待进一步的基因组 DNA-DNA 杂交证明,但 16S rRNA 基因序列分析的结果提示,我们所获得的 11 个稀有菌属中,有 7 个属的代表菌株有可能是新种。由分离菌株的多样性可见,本研究设计的嗜酸丝状放线菌的选择性分离方法比以往的方法更具优势,不仅出菌率高,而且分离菌株多样性丰富。

放线菌的传统分类主要依据表型特征,其研究繁琐耗时,且结果可比性较差。分子生物学技术,尤其是 16S rRNA 基因序列分析,为放线菌的快速鉴定提供了有利条件。本研究发现,同一表观颜色类群的菌株往往处于不同的 16S rRNA 进化类群中,如:17 株白色类群代表菌株分布于 8 个进化类群,7 株灰类群菌株、5 株黄色类群菌株和 2 株灰褐类群菌株均分别分布于 2 个进化类群;而同一进化类群有时又包括了不同颜色类群的菌株,如进化类群 I 包括了白色和黄色两种颜色类群,进化类群 VII 包括了白色和灰褐两种颜色类群。表明表观颜色分群和 16S rRNA 的进化类群存在差异,单一的颜色分群不是分类去重复的合理手段,还应该需辅助其它特征。分子分类与传统分类的结果往往存在不一致性,希望随着技术的进步,以及理论和实践的积累,分子方法和传统方法会越来越更好地结合起来,更有效地解决放线菌研究中的系统分类问题。

参考文献

- [1] Busti E, Monciardini P, Cavaletti L, et al. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology*, 2006, 152: 675 – 683.
- [2] Seong CN, Goodfellow M, Ward AC, et al. Numerical classification of acidophilic actinomycetes isolated from acid soil in Korea. *The Journal of Microbiology (Korea)*, 1993, 31: 355 – 363.
- [3] Kim SB, Seong CN, Jeon SJ, et al. Taxonomic study on neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 211 – 214.
- [4] Xu C, Wang L, Cui Q, et al. Neutrotolerant acidophilic *Streptomyces* species isolated from acidic soils in China: *Streptomyces guanduensis* sp. nov., *Streptomyces paucisporeus* sp. nov., *Streptomyces rubidus* sp. nov. and *Streptomyces yanglinensis* sp. nov. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1109 – 1115.
- [5] Williams ST, Davies FL, Mayfield CI. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. II. The pH requirements of streptomycetes from two acid soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1971, 3: 187 – 195.
- [6] Kim SB, Lonsdale J, Seong CN, et al. *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici (1943)AL emend. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, 83: 107 – 116.
- [7] Huang Y, Cui Q, Wang L, et al. *Streptacidiphilus jiangxiensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in China. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2004, 86: 159 – 165.
- [8] Wang L, Huang Y, Liu Z, et al. *Streptacidiphilus oryzae* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a rice field soil in China. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1257 – 1261.
- [9] Busti E, Cavaletti L, Monciardini P, et al. *Catenulispora acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel, mycelium-forming actinomycete; and proposal of *Catenulisporaceae* fam. nov. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1741 – 1746.
- [10] Cavaletti L, Monciardini P, Schumann P, et al. *Actinospica robiniae* gen. nov., sp. nov. and *Actinospica acidiphila* sp. nov.: proposal for *Actinospicaceae* fam. nov. and *Catenulisporinae* subord. nov. in the order *Actinomycetales*. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1747 – 1753.
- [11] Tamura T, Ishida Y, Otaguro M, et al. *Catenulispora subtropica* sp. nov. and *Catenulispora yoronensis* sp. nov. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58: 1552 – 1555.
- [12] Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, et al. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 7210 – 7215.
- [13] Sait M, Hugenholtz P, Janssen PH. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology*, 2002, 4: 654 – 666.
- [14] Schoenborn L, Yates PS, Grinton BE, et al. Liquid serial dilution is inferior to solid media for isolation of cultures representative of the phylum-level diversity of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 4363 –

- [15] Hayakawa M. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil. *Actinomycetologica*, 2008, 22: 12 – 19.
- [16] 王黎明, 黄英, 崔庆峰, 等. 应用分散和差速离心法分离嗜酸和耐酸链霉菌的试验及评价. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2003, 30: 104 – 106.
- [17] Seong CN, Choi JH, Baik KS. An improved selective isolation of rare actinomycetes from forest soil. *The Journal of Microbiology (Korea)*, 2001, 39: 17 – 23.
- [18] Chun JS, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S ribosomal-RNA gene-sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45: 240 – 245.
- [19] Stackebrandt E, Liesack W. Nucleic acids and classification systematics/Goodfellow M, O'Donnell A G. Handbook of new bacterial systematics. London: Academic Press Inc, 1993.
- [20] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150 – 163.
- [21] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111 – 120.
- [22] 徐春光, 梁秀梅, 黄英, 王黎明, 等. 云南酸性土壤中嗜酸链霉菌的多样性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2008, 48: 421 – 425.
- [23] Cho SH, Han JH, Seong CN, et al. Phylogenetic diversity of acidophilic sporoactinobacteria isolated from various soils. *The Journal of Microbiology (Korea)*, 2006, 44: 600 – 606.
- [24] 崔庆峰, 王黎明, 刘志恒, 等. 酸性土壤中嗜酸稀有放线菌的多样性研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2004, 44: 571 – 575.

Selective isolation and diversity of acidophilic filamentous actinomycetes from acidic soils

Yun Ding^{1,2}, Ying Huang^{1*}, Jisheng Ruan¹, Yongsheng Gao²

(¹ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(² College of Land Resources and Environment, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: [Objective] To establish effective methods for selective isolation of acidophilic filamentous actinomycetes from acidic soils, and to investigate their genus and species diversity. [Methods] Four pretreatments and 5 media supplemented with different inhibitors were used for isolation. The best combination of methods was determined according to the number and ratio of actinomycete colonies on plates, and was applied to isolate actinomycetes from 17 acidic soil samples collected in Jiangxi Province. The isolates were grouped based on cultural characteristics. The micromorphology and pH growth range of each group were studied to choose the representative isolates, which were subsequently subjected to 16S rRNA gene analysis to investigate their diversity. [Results] We found the best isolation approach involved Dispersion and Differential Centrifugation (DDC) pretreatment and GTV medium supplemented with cycloheximide, nalidixic acid nystatin (each at 50 mg/L). 369 isolates were obtained, and were assigned to 10 color groups. 6.6% of the isolates were strictly acidophilic actinomycetes, 72.4% were neutrotolerant acidophilic actinomycetes, and 21.0% were acidotolerant ones. The 52 representative isolates belong to 12 recognized genera: 30 of them fall within the genus *Streptomyces*, 6 belong to *Micromonospora*, 3 belong to *Nocardia*, 3 belong to *Nonomuraea*, 2 belong to *Kribbella*, 2 belong to *Microbispora*, and the other 6 strains belong to *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Dactylosporangium*, *Lentzea*, *Planotetraspora* and *Streptacidiphilus*, respectively. The *Streptomyces* isolates formed 12 evolutionary groups in the *Streptomyces* 16S rRNA gene tree. [Conclusion] The selective isolation approach established here is robust for isolating various acidophilic filamentous actinomycetes from soil. Acidic soils in Jiangxi Province harbor abundant and diverse acidophilic actinomycetes.

Keywords: acidophilic actinomycetes; filamentous actinomycetes; selective isolation; diversity; soil

(本文责编:王晋芳)