

新疆泥火山产酶嗜盐放线菌的筛选及多样性

马小龙^{1, 2}, 王芸², 杨红梅², 王纯利¹, 毛培宏³, 金湘³,
常玮², 房世杰², 张评泮⁴, 娄恺^{2*}

(¹新疆农业大学资源与环境学院, 乌鲁木齐 830052)

(²新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091)

(³新疆大学离子束生物技术中心, 乌鲁木齐 830008)

(⁴中国药科大学新药筛选中心, 南京 210038)

摘要:【目的】了解新疆乌苏泥火山嗜盐放线菌及其产酶功能多样性。【方法】分别采用含有 5% 与 10% NaCl 的 5 种分离培养基, 稀释平板涂布法对泥火山土壤样品进行分离; 利用五种筛选培养基定性检测酶活性; 在形态特征、耐盐性实验及 16S rDNA 基因测序的基础上进行系统发育学分析。【结果】获得嗜盐放线菌 43 株, 极端嗜盐放线菌 3 株。4 株嗜盐放线菌产脂肪酶, 30 株产半乳糖苷酶, 27 株产淀粉酶, 6 株产酯酶, 4 株产纤维素酶, 1 株同时产 4 种酶。系统发育学分析结果表明其中 24 株为拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*), 1 株为链霉菌属(*Streptomyces*)。产两种酶的菌株 10006 与 *Nocardiopsis exhalans* (AY03600) 相似性为 96.64% (小于 97%), 可能是潜在的新种。【结论】本研究表明新疆乌苏泥火山中存在大量的产半乳糖苷酶及淀粉酶的嗜盐放线菌, 所分离到的拟诺卡氏菌属产酶多样性比较高, 并且潜藏着新的微生物资源。

关键词: 泥火山; 放线菌; 盐碱环境

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 08-1001-05

泥火山与一般的火山不同, 并非由岩浆形成, 而是夹带着不同年龄和不同性质的泥浆、砂、盐粉和岩屑的地下天然气, 在压力作用下不断喷出地表所堆成的泥丘, 是在特定的地质条件下形成的罕见自然地质景观。

近年来, 国外学者对海底及陆地泥火山的地质、地球物理、生物地球化学及微生物多样性进行了广泛研究^[1-4], 并在功能微生物领域有重要发现^[5]。中国最大的泥火山群位于新疆, 国内研究主要集中在其地质年代^[6]、分布、构造及与地震活动的关系^[7]等方面, 有关微生物的研究还未有报道。本文重点研究了新疆乌苏泥火山嗜盐放线菌多样性及其产酶特性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: PCR 引物、PCR 常规操作试剂和酶均购自 TaKaRa 公司。PCR 仪为 Eppendorf AG 22331 Hamburg; 凝胶成像系统 GK-330C 购自美国联合生物科技有限公司。

1.1.2 培养基: 分离培养基: 淀粉酪素培养基^[8], BP 培养基^[9], 淀粉-酵母膏培养基^[10], 天门冬酰胺-甘油 (ISP₅) 培养基^[11], 淀粉琼脂培养基。所有培养基加 K₂Cr₇O₄ (50 mg/L) 可有效抑制真菌和细菌, pH 用 Na₂CO₃ 调到 pH 8~9, 并加 5% 与 10% 的 NaCl, 培

基金项目: 国家科技基础条件平台项目(2005DKA21201-12); 新疆特殊环境微生物重点实验室开放课题(XJYS0203-2005-01); 新疆农科院青年科技创新基金(2007Q07)

*通讯作者。Tel/Fax: +86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

作者简介: 马小龙(1983-), 男, 新疆人, 硕士研究生, 主要从事微生物资源与环境研究。E-mail: mxl012@163.com

收稿日期: 2008-02-01; 修回日期: 2008-03-25

养温度 28 ℃。用于酶活筛选的基础培养基为 ISP₅ (5% NaCl)。筛选淀粉酶、酯酶、纤维素酶、半乳糖苷酶、脂肪酶的培养基分别为基础培养基加入可溶性淀粉(1%)、吐温 80(1%)、羧甲基纤维素钠(1%)、X-gal (2 mL/L)、橄榄油(12%)与聚乙烯醇(PVA)(2%) 1:3 混合。

1.1.3 样品采集: 在新疆乌苏市(44° 11' 00" N, 84° 23' 20" E)采集泥火山土壤样品, 车载冰箱 4 保存运回实验室。

1.2 泥火山化学成分的测定方法

按照森林土壤水溶性盐分析标准(GB7871 - 87): CO₃²⁻和 HCO₃⁻ 离子采用双指示剂中和滴定法测定, Ca²⁺和 Mg²⁺离子采用 EDTA 络合滴定法测定, Na⁺和 K⁺离子采用火焰光度计法测定, Cl⁻和 SO₄²⁻离子采用离子色谱法测定, 土壤全盐含量采用计算法获得。

1.3 放线菌的分离与鉴定

采用稀释平板涂布法对土壤样品进行分离, 28 ℃ 培养 7~15 d, 用划线分离法对菌株进一步的纯化分离。初步去除重复的菌株, 余下具有代表性的放线菌进一步进行 NaCl 与 KCl 的盐耐受实验及酶活测定, 通过形态与培养特征观察, 将链霉菌鉴定到属^[12,13]。

1.4 形态观察

用 ISP₅ 培养基(含 5% NaCl)于 28 ℃ 条件下进行埋片培养, 培养 7、14、21 和 28 d, 分别取出埋片, 用光学显微镜观察形态。

1.5 NaCl 和 KCl 耐受实验

参见文献[11]的方法进行操作。

1.6 酶活筛选方法

参见文献[14, 15]的方法进行。

1.7 16S rDNA PCR 扩增和系统进化分析

1.7.1 DNA 扩增: 参照文献[16] 方法提取 DNA。用细菌 16S rDNA 通用引物(正向引物:8-27F, 5'-AGAG-TTTGATCCTGGCTCAG-3' 和反向引物:1429-1445R, 5'-TTAAGGATGGTGATGCCGCA-3')进行扩增。反应条件为: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 45 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 2 min, 30 个循环; 72 ℃ 5 min。16S rRNA 扩增产物的纯化及测序由上海生物工程有限公司 (Biotechnology

Limited Company of Shanghai) 协助完成。

1.7.2 系统发育树的构建: 将序列提交 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 用 Blast 软件在 GenBank 网站上进行相似性搜索, 获取相近典型菌株的 16S rDNA 基因序列, 用 CLUSTAL_X^[17]进行多重序列比对, 利用 MEGA version 3.0^[18]软件包采用邻接法(Neighbor-Joining method)进行聚类分析和系统进化树构建。

2 结果

2.1 泥火山样品的物化分析

泥火山土壤样品的化学组分测定结果表明, 阳离子 Na⁺ 及阴离子 HCO₃⁻ 和 Cl⁻ 浓度较高(表 1), pH 8.5~8.8, 因此判断拟分离微生物生长环境属高盐碱, 为分离培养基的设计提供了理论基础。由于 Ca²⁺, K⁺ 的浓度较低, 选取其中一种离子浓度做耐受性实验。

2.2 嗜盐放线菌的分离

到目前为止, 国内外对嗜盐放线菌划分标准如表 2 所示^[19]。将分离纯化后的菌株经形态观察, 初步淘汰重复菌株后, 得到 43 株嗜盐放线菌。

结果表明(表 3), 最适 NaCl 浓度为 0%~10% 时, 35 株生长, 占供试放线菌的 79%; 最适 NaCl 浓度为 5%~10% 时, 30 株生长, 占供试菌株的 69%, 属于中度嗜盐放线菌; 最适 NaCl 浓度达到 15%, 10004、10021、10046 等 3 株菌生长, 属于极端嗜盐放线菌(Extreme halophilic actinomycetes)。由此可知乌苏泥火山生境中存在大量的中度嗜盐放线菌和少量的极端嗜盐放线菌。从培养基分离效果来看, ISP₅ 和高氏培养基较好, 其分离到的菌株大都为嗜盐放线菌。

2.3 嗜盐放线菌 NaCl 和 KCl 耐受实验

实验结果表明大部分中度嗜盐放线菌, 生长所需的 Na⁺ 完全可以被一定浓度的 K⁺ 所替代。如 10021, 不仅能够适应高浓度的 NaCl, 也能适应高浓度的 KCl (表 3)。但也有少数中度嗜盐放线菌例外, 如 10042 能在一定浓度的 Na⁺ 下生长, 却不能在一定浓度 K⁺ 的条件下生长, 这说明了中度嗜盐放线菌对不同类型阳离子的适应是有选择性的。

表 1 新疆乌苏泥火山主要离子组成

Table 1 Composition of main ion of mud volcano in Usu county, Xinjiang

Sample[0] concentration/(g/L)							
Main cations				Main anions			
Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻
0.0242	ND ^a	0.0008	1.493	0.7755	3.1573	2.9721	1.3465

a. Not determined.

表 2 嗜盐放线菌的分类标准

Table 2 Classification standard of halophilic actinomycetes

Classification	Standard
Halophilic actinomycetes	Optimum NaCl/%
Weak halophilic actinomycetes	0.2–0.5 mol/L(1.17%–2.93% NaCl)
Moderate halophilic actinomycetes	0.5–2.5 mol/L(2.93%–14.63% NaCl)
Extreme halophilic actinomycetes	2.5–5.2 mol/L(14.63%–30.4% NaCl)

表 3 新疆泥火山嗜盐放线菌耐盐及产酶特征

Table 3 Characteristics of salt-tolerance and enzyme-producing of the halophilic actinomycetes from Mud Volcano in Usu county, Xinjiang

Strains No.	Optimum NaCl/%	Optimum KCl/%	Galactosidase	Cellulase	Esterase	Amylase	Lipase
10001	10	5–10	+	-	-	-	-
10003	5–10	5–10	+	-	-	+	-
10004	5–15	5–15	-	-	+	+	-
10005	0–10	0–5	+	-	-	-	-
10006	0–10	0–10	+	-	-	-	+
10009	5–10	5–15	+	-	-	+	-
10010	0–5	5–10	+	-	-	+	-
10011	5–10	5–10	+	-	-	-	-
10012	5–10	5–15	+	-	-	-	+
10013	5–10	5–10	+	-	-	-	-
10014	5–10	5–10	+	-	-	-	+
10017	5–10	5–10	-	-	-	+	-
10020	5–10	5–10	+	-	+	-	-
10021	5–15	0–10	+	-	-	+	-
10023	5–10	5–10	-	-	-	+	-
10024	5–10	5–15	+	-	-	-	-
10026	0–5	5–10	+	-	+	+	-
10027	0–10	10–15	-	-	-	+	-
10028	5–10	5–15	-	+	-	+	-
10029	5–10	5–10	+	-	-	+	-
10030	5–10	5–10	+	-	+	+	-
10031	5–10	5–15	+	-	-	+	-
10032	5–10	5–10	+	-	-	-	-
10033	5–10	5–10	+	-	-	+	-
10034	0–10	5–15	+	-	-	-	-
10035	5–10	5–10	-	-	-	-	-
10036	5–10	5–15	+	-	-	+	-
10037	5–10	5–10	+	-	+	+	-
10038	5–10	5–15	-	-	+	+	-
10039	5–10	5–10	+	-	-	+	-
10040	10	0–10	-	-	-	+	-
10041	5–10	10	-	+	-	+	-
10042	5–10	0	-	+	-	+	-
10045	5–10	5–10	+	-	-	-	-
10046	5–15	5–10	-	-	-	-	-
10047	5–10	10–15	-	-	-	+	-
10048	5–10	5–10	+	-	-	+	-
10050	5–10	5–10	+	-	-	+	-
10051	5	5–10	+	-	-	-	-
10054	0–10	0–10	+	-	-	+	-
10055	5–10	5–10	+	+	-	+	+
10057	5–10	15	+	-	-	-	-
10058	0–10	5–10	-	-	-	+	-

+: Positive; -: Negative.

2.4 产酶嗜盐放线菌的筛选

功能酶筛选结果表明, 4 株嗜盐放线菌产脂肪酶, 30 株产半乳糖苷酶, 27 株产淀粉酶, 6 株产酯酶, 4 株产纤维素酶, 1 株同时产四种酶(表 3)。半乳糖苷酶与淀粉酶产生菌分别占总菌数的 70% 及 65% 以上, 脂肪酶、纤维素酶及酯酶产生菌均较少, 因此可初步判断乌苏泥火山这一特殊生境中存在有大量的产半乳糖苷酶及淀粉酶的放线菌。

2.5 产酶嗜盐放线菌系统发育分析

根据形态特征、耐盐性实验及酶学筛选结果, 测定其中 25 株中度嗜盐放线菌 16S rDNA 序列, 序列比对结果表明只有一株为链霉菌属(*Streptomyces*), 其余均为拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*), 进一步选取其中产 2 种酶活以上的 7 株菌(除 10024)进行系统进化分析(图 1)。菌 10035 与 *Streptomyces paulus* 相似性达到了 100%, 可能为同一个种; 嗜盐放线菌目前一共有 5 个属, 其中拟诺卡氏菌属有 33 个有效种, 比对发现有 3 株(10013, 10024, 10032)与从盐环境中分离到的嗜盐放线菌 *Nocardiopsis salina* (AY373031)^[11]相似性为 98.79%, 99.91%, 99.97% (选代表 10024); 有两株(10054 与 10006)与 *Nocardiopsis exhalans* (AY03600)相似性为 96.64% 和 96.73% (选代表 10006), 可能为新种, 还需要生理学特性和 DNA 杂交实验进一步证实; 10009 及 10036 相似性大于 99.9%, 其耐盐性与酶活性均相同, 并且与 *Nocardiopsis umidischolae* (AB368715) 相似性分别为 98.96% 和 98.26%, 这表明它们可能是同一种菌; 产 4 种酶的 10055 与 *Nocardiopsis umidischolae* (AB368715) 相似性为 98.67%, 产 3 种酶的 10026 与 *Nocardiopsis umidischolae* (AB368715) 相似性为 98.87%; 10055, 10026, 10009 与 *Nocardiopsis umidischolae* (AB368715) 相似性相似性很高, 但耐盐性与酶活性均不相同, 可能为不同的菌; 根据拟诺卡氏菌属的酶活数据, 可以推断出, 从泥火山样品中所分离到的拟诺卡氏菌属产酶多样性比较高。

3 讨论

在新疆泥火山中只分离到拟诺卡氏菌属与链霉菌属, 并且前者菌株数量明显大于后者, 其主要原因可能是受到了分离方法的限制, 若在分离培养基组分上有所突破, 则可能获得更多极端环境放线菌。

对分离到的 43 株中度嗜盐放线菌, 通过研究 Na^+ 、 K^+ 的关系, 进一步的证明了中度嗜盐或耐盐

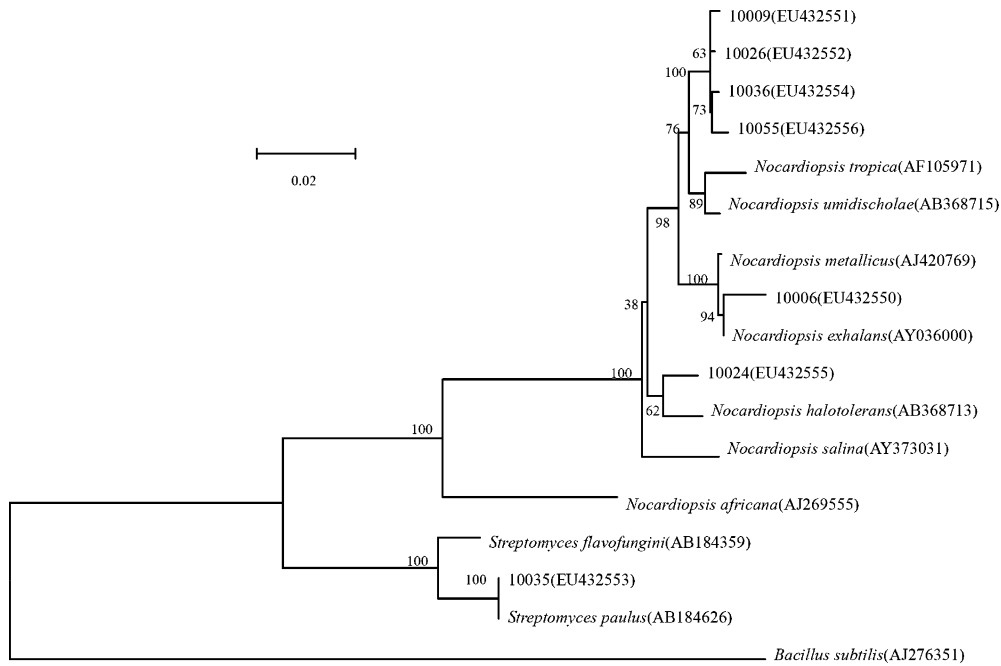


图 1 新疆乌苏泥火山部分嗜盐放线菌菌株的系统发育树状关系图

Fig. 1 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among 16S rDNA gene sequences obtained from the partial halophilic actinomycete strains of Usu Mud Volcanos in Xinjiang. Their closely related sequences downloaded from GenBank etc. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled data sets. Bar, 0.02 sequence divergence. Sequences accession numbers in GenBank are in brackets.

放线菌对这些阳离子具有选择性^[20],这对今后高盐环境放线菌的分离和培养有一定的指导和参考价值。

在酶活筛选上,大部分为半乳糖苷酶,淀粉酶产生菌,少部分为的酯酶,纤维素酶,脂肪酶产生菌,对此现象,这与泥火山这一特殊的生态环境有关,对于所分离到的产酶嗜盐放线菌,可继续对其酶学性质、生长温度及 pH 范围等进行研究,希望能从中得到功能特异型菌株。

通过对新疆泥火山中可培养产酶嗜盐放线菌筛选及多样性分析,发现了一些有利用价值的菌种资源,这对泥火山进一步开发利用有很大的价值。

参 考 文 献

- [1] Alain K, Holler T, Musat F, *et al.* Microbiological investigation of methane and hydrocarbon-discharging mud volcanoes in the Carpathian Mountains, Romania. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(4): 574–590.
- [2] Martinez RJ, Mills HJ, Sobecky PA, *et al.* Prokaryotic diversity and metabolically active microbial populations in sediments from an active mud volcano in the Gulf of Mexico. *Environ Microbiol*, 2006, 8: 1783–1796.
- [3] Heijs SK, Sinninghe Damste JS, Forney LJ. Characterization of a deep-sea microbial mat from an active cold seep at the Milano mud volcano in the Eastern Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol*, 2005, 54: 47–56.
- [4] Yakimov MM, Giuliano L, Crisafi E, *et al.* Microbial community of saline mud volcano at San Biagio-Belpasso, Mt. Etna (Italy). *Environ Microbiol*, 2002, 4: 249–256.
- [5] Niemann H, Lösekann T, de Beer D, *et al.* Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. *Nature*, 2006, 443(5227): 854–858.
- [6] 詹家祯, 甘振波. 新疆独山子泥火山溢物中的孢子花粉. *新疆石油地质(Xinjiang Petroleum Geology)*, 1998, 19(1): 57–59.
- [7] 王道. 新疆北天山地区泥火山与地震. *内陆地震(Inland Earthquake)*, 2000, 14(4): 350–353.
- [8] 唐蜀昆, 姜怡, 姜恺, 等. 嗜盐放线菌分离方法. *微生物学通报(Microbiology)*, 2007, 34(2): 390–392.
- [9] 黄路枝, 胡兆农, 郭正彦, 等. 土壤稀有放线菌的选择性分离及其抗菌活性研究. *农药学报(Chinese Journal of Pesticide Science)*, 2007, 9(1): 59–65.
- [10] 姜怡, 唐蜀昆, 王永霞, 等. 海洋放线菌分离方法. *微生物学通报(Microbiology)*, 2006, 33 (6): 153–155
- [11] 唐蜀昆, 李文均, 徐丽华, 等. 嗜盐放线菌生物学特性初步研究. *微生物学通报(Microbiology)*, 2003, 30(4): 15–19.
- [12] 阎逊初. 放线菌的分类与鉴定. 第一版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [13] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组编著. 链霉菌鉴定手册.

- 第一版. 北京科学出版社, 1975.
- [14] Sánchez-Porro C, Martín S, Mellado E, *et al.* Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, 9(4): 295–300.
- [15] Casaburi A, Villani F, Toldrá F, *et al.* Protease and esterase activity of staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 3: 223–229.
- [16] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 等. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法. *生物技术(Biotechnology)*, 2007, 2(1): 39–41.
- [17] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876–4882.
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150–163.
- [19] 张永光, 李文均, 姜成林, 等. 嗜盐放线菌的研究进展. *微生物学杂志(Journal of Microbiology)*, 2002, 22(4): 45–48.
- [20] 王栋, 唐蜀昆, 李文均, 等. 中度嗜盐或耐盐放线菌生长对阴离子选择性研究. *微生物学通报(Microbiology)*, 2005, 32(1): 1–4.

Diversity of halophilic actinomycetes from mud volcano in Xinjiang

Xiaolong Ma^{1,2}, Yun Wang², Hongmei Yang², Chunli Wang¹, Peihong Mao³, Xiang Jin³, Wei Chang², Shijie Fang², Pinghu Zhang⁴, Kai Lou^{2*}

¹College of Resource and Environment, Xinjiang Agriculture University, Urumqi 830052, China

²Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China

³The center of Ion Beam Biotechnology, Xinjiang University, Urumqi 830008, China

⁴New Drug Screening Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China

Abstract: [Objective] To know halophilic actinomycetes and their enzyme-producing ability from mud volcano in Usu County, Xinjiang, China. [Methods] Soil samples in mud volcano were isolated with five isolation media containing 5% and 10% NaCl (w/v) with dilution-plate method. The activities of lipase, galactosidase, amylase, esterase and cellulase from isolated strains were qualitatively detected by using five selective media. Base on morphological characteristics, test of salt tolerance, screening of enzymatic characters and sequencing of 16S rDNA gene, strains were selected for phylogenetic analysis. [Results] A total of 43 halophilic actinomycetes and 3 extreme halophilic actinomycetes were obtained. Screening results for enzyme activity showed that 4 halophilic actinomycetes produced lipase, 30 strains produced galactosidase, 27 strains produced amylase, 6 strains produced esterase, 4 strains produced cellulose and 1 strain produced 4 enzymes simultaneously. According to 16S rDNA sequence analysis, 24 of 25 detected sequences were affiliated with *Nocardopsis*, and the other one was *Streptomyces*. In the phylogenetic tree, strain 10006 producing 2 enzymes and *Nocardopsis exhalans* (AY03600) showed 96.64% similarity (less than 97%), which indicated that strain 10006 was a possible new species. [Conclusion] There are plenty of galactosidase or amylase-producing halophilic actinomycetes and higher enzyme-producing diversity of *Nocardopsis* in Usu mud volcano. In addition, there are potential microbial resources in this extreme environment.

Keywords: mud volcano; Actinomycetes; saline environment

Supported by the Project of China National Science and Technology Platform (2005DKA21201-12), the Open Project of the Key Lab of Microorganisms in Xinjiang Specific Environment (XJYS0203-2005-01) and the Project of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences (2007Q07)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 1 February 2008/ Revised: 25 March 2008