

# 云南江城和黑井盐矿沉积物未培养 放线菌多样性比较

吴晋元<sup>1</sup> 职晓阳<sup>1</sup> 李 岩<sup>1</sup> 关统伟<sup>2</sup> 唐蜀昆<sup>1</sup> 徐丽华<sup>1</sup> 李文均<sup>1\*</sup>

(1. 云南大学 云南省微生物研究所 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室 昆明 650091)  
(2. 塔里木大学 新疆兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 阿拉尔 843300)

**摘 要:** 类群特异性引物的应用使得研究者可以对感兴趣的微生物类群进行针对性研究。围绕云南江城和黑井两个地区的 3 个盐矿样点沉积物中放线菌的多样性和群落组成, 我们通过放线菌特异性引物对总 DNA 进行 16S rRNA 基因扩增, 经过克隆文库构建, 利用酶切并选择其中不同带型的 133 个克隆的 16S rRNA 基因插入片段进行测序。系统发育分析和统计学结果表明, 两地放线菌 16S rRNA 基因克隆广泛分布于整个放线菌门, 同时发现部分序列可能属于放线菌的新类群。分析结果还预示, 江城和黑井两地盐矿虽处云南不同地域含盐区, 但两地未培养放线菌物种多样性和系统发育关系均较为相似。

**关键词:** 盐矿, 极端环境, 放线菌多样性, 免培养技术

## Comparison of Actinobacterial Diversity in Jiangcheng and Heijing Saline Mines in Yunnan by Using Culture-independent Approach

WU Jin-Yuan<sup>1</sup> ZHI Xiao-Yang<sup>1</sup> LI Yan<sup>1</sup> GUAN Tong-Wei<sup>2</sup>  
TANG Shu-Kun<sup>1</sup> XU Li-Hua<sup>1</sup> LI Wen-Jun<sup>1\*</sup>

(1. The Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan  
Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)  
(2. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang  
Production & Constuction Corps, Tarim University, Alar 843300)

**Abstract:** Actinobacterial diversity in samples of saline mines was investigated by constructing three actinobacterium-specific 16S rRNA gene clone libraries from Jiangcheng salt mine and Heijing brine pits. The primers for the Class *Actinobacteria* were used to construct the 16S rRNA gene clone libraries. At least 469 purified clones were digested with *Hae* III for RFLP analysis, in order to separate the clones into groups according to their restriction patterns. Among of them, 133 sequences were selected and determined for their partial 16S rRNA gene sequences. The result of phylogenetic and statistic analyses indicated that actinobac-

基金项目: 国家“973 项目”(No. 2004CB719601); 国家自然科学基金项目(No. 30600001); 教育部科学技术重点项目(No. 206139);  
教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-05-0821); 云南省应用基础研究计划面上项目(No. 2007C167M)

\* 通讯作者: Tel/Fax: 0871-5033335; ✉: wjli@ynu.edu.cn; liact@hotmail.com © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>  
收稿日期: 2008-03-03; 接受日期: 2008-04-22

terial OTUs were closely related to most members of the Class *Actinobacteria*, and some OTUs may represent some unknown groups. Heijing and Jiangcheng located in different saline places of Yunnan, China. However, the communities, species diversity of *Actinobacteria* and Phylogenetic relationship from the two saline mines were similar.

**Keywords:** Saline mine, Extreme environments, Actinobacterial diversity, Culture-independent approach

极端环境微生物作为地球上特殊的生命形式, 它们在适应环境的过程中形成极为特殊的生理机制, 并产生特殊的代谢产物, 如多种多样的特殊酶类(耐热酶、碱性酶等)及各种生物活性物质, 这些活性产物在国民生产中具有广泛的应用价值<sup>[1]</sup>。高盐环境下微生物作为极端微生物中的一个类群, 逐渐为人们所认识, 目前国内外对不同地域的高盐环境下微生物多样性研究已有报道<sup>[2,3]</sup>。同时, 嗜盐微生物不仅为我们开发盐环境生物资源提供材料, 也是我们研究早期地球生物形式和地外生命形式的先导<sup>[4]</sup>。

放线菌是广泛地分布于土壤中的优势微生物类群, 它们对降解环境有机化合物和有机物的矿化有着重要功能, 是环境微生物群落中的重要成员, 放线菌同时也是人类抗生素的主要来源生物<sup>[5]</sup>。然而要全面了解土壤中的微生物是很困难的, 目前只有极少一部分微生物是可以被培养的, 绝大多数因为无法培养而不为人所知。用分子生物学手段研究环境中微生物多样性的结果表明, 土壤环境仍存在大量未获得纯培养的微生物<sup>[6,7]</sup>。基于土壤微生物群落总 DNA 的分子生态学方法避免了传统分离培养方法的缺点, 因此被广泛应用于土壤微生物群落结构功能研究<sup>[8]</sup>。通过免培养技术(Culture-independent)调查高盐环境下的放线菌资源能使我们充分了解环境中放线菌多样性, 对于我们认识未知微生物提供数据支持。黑井和江城盐矿由于处于云南特殊的地理环境, 生态系统较为稳定, 研究该地区高盐极端环境下放线菌多样性为我们开发和利用这部分宝贵资源提供数据和材料。本研究采用针对放线菌门设计的特异性引物构建了黑井和江城盐矿 3 个样点的放线菌 16S rRNA 基因文库, 并利用统计学方法研究了各样点生物物种多样性指数。本文首次报道在云南江城和黑井地区盐矿中发现大量未培养未知放线菌类群。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

所采集样品均为高盐矿土沉积物, 其中 1 个样品(样品编号: 江城样点)采自云南省思茅地区江城勐野钾盐井, 2 个样品采自黑井县自然分布的 1 个古盐井(样品编号: 黑井 H10 样点)以及 1 个含盐岩壁样点(样品编号: 黑井 H2 样点)。样品采集后黑暗保存, 实验室-70℃ 黑暗保藏。

### 1.2 总 DNA 提取

参考国内外相关报道<sup>[8-10]</sup>, 并结合样品自身特性, 我们采用 SDS-CTAB 抽提法提取放线菌宏基因组 DNA。将 5 g 沉积物样品加入 12 mL 提取缓冲液(0.1 mol/L  $\text{N}_2\text{HPO}_4$ , 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L Tris base, 1.5 mol/L NaCl)和 500  $\mu\text{L}$  的溶菌酶(50 mg/mL), 37℃ 振荡 30 min, 然后加入 70  $\mu\text{L}$  (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 Proteinase K 及 1.5 mL 20% CTAB, 振荡混匀后, 再加入 1.5 mL 20% SDS, 65℃ 水浴加热 2 h (每隔 15 min 摇匀 1 次)。将上述样品处理液加入等体积的酚氯仿(酚: 氯仿: 异戊醇 25: 24: 1, V/V), 重复抽提 2 次(12000 r/min, 15 min)。在上清液中加入 0.6 倍体积异丙醇, 弃上清液后加入 40  $\mu\text{L}$  TE 缓冲液溶解, 得到总 DNA 样品。

### 1.3 PCR 扩增放线菌 16S rRNA 基因序列

应用放线菌门特异性引物<sup>[11]</sup>对土壤总 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增片段大小约为 640 bp。

### 1.4 克隆、酶切筛选、测序及系统发育分析

用平行的 3 管反应体系(每管 50  $\mu\text{L}$ )进行扩增, 将目的条带通过 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化处理。纯化产物通过 T4 DNA 连接酶与载体进行连接, 并转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。转化产物涂布在含有氨苄青霉素(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 LB 平板, 随机挑取克隆子划线培养。PCR 扩增出插入的放线菌 16S rRNA 基因片段后用 *Hae* 酶切 3 h, 选出酶切带谱不同的重组子进行测序。序列用 CLUSTALX 进行系统发育分析, 用邻接法构建出系统进化树。

## 1.5 物种多样性指数分析

对获得的序列信息进行比对并进行分类操作单元(Operational Taxonomic Unit, OTU)检测, 划分标准为将每个样点的序列以 $\geq 99.0\%$ 相似性划分为一个 OTU<sup>[12]</sup>。稀有度曲线分析采用 Analytic Rarefaction version 1.3 软件(S. M. Holland; [www.uga.edu/strata/software/Software.html](http://www.uga.edu/strata/software/Software.html))。多样性指数分析采用 SPADE 软件(species prediction and diversity estimation; A.Chao and T.-J. Shen [<http://chao.stat.nthu.edu.tw>])。

## 2 结果和分析

### 2.1 16S rRNA 基因文库构建

从每份所采集样品中的 5 g 沉积物土样提取并纯化获得 40  $\mu$ L 土壤总 DNA, 经 PCR 扩增、连接、转化、克隆筛选并测序。共筛选 469 个克隆, 其中黑井 H10 样点文库随机选取 196 个克隆, 黑井 H2 样点文库选取 134 个克隆, 江城样点文库选取 139 个克隆。经过 *Hae* 酶切筛选后, 黑井 H2 样点文库测序 34 个克隆的 16S rRNA 基因插入片段, 黑井 H10 样点文库测序 51 个克隆, 江城样点文库测序 48 个克隆。序列信息已在 GenBank 数据库中注册(EU532492-EU532596)。

### 2.2 16S rRNA 基因序列分析

将测序获得的 133 个克隆的 16S rRNA 基因插入片段序列与 GenBank 数据库中已知序列进行比对分析, RDP 数据库嵌合体检测后去掉 3 条序列。分析得到黑井 H2 样点 25 个 OTUs, 黑井 H10 样点 40 个 OTUs, 江城 1 样点 34 个 OTUs。每个 OTU 选取一条有效序列与已知放线菌类群的序列, 并以 *Bacillus subtilis* 的 16S rRNA 基因序列为外群构建系统发育树。可以看出这些序列分属于整个放线菌门(Actinobacteria)类群。在酸微菌亚纲(Acidimicrobiales)和放线菌亚纲(Actinobacteriales)有广泛分布, 同时还可能存在可能为新亚目或更高级分类单元的类群(图 1)。发现 48% (63/130)的克隆序列与已鉴定的菌株 16S rRNA 基因序列相似性达到 97%以上, 其中, 28% (37/130)的克隆序列与已鉴定的菌株相似性达到 99%以上, 有 26% (30/130)的克隆序列与已鉴定的菌株相似性小于 87%。

在所有 99 个 OTUs 中, 66 个处于放线菌亚纲内,

15 个属于酸微菌亚纲, 18 个不能与已知序列聚在一起。没有发现与红色杆菌亚纲(Rubrobacteriales)和科里氏杆菌亚纲(Coriobacteriales)亲缘关系较近的类群。但江城样点克隆序列 JCMYJSC10、JCMYJSB15、JCMYJSA19、JCMYJSB3、JCMYJSA44、JCMYJSA34 和黑井 H2 样点克隆序列 HJH2SS79、HJH2SS17、HJH2SS107 聚为一个分类地位较高的分支上, 并且处于红色杆菌亚纲和科里氏杆菌亚纲分支之间, 我们认为这些序列可能预示着这两个样点有处于放线菌纲类新亚纲一级分类单元的新类群。江城样点克隆序列 JCMYJSB11、JCMYJSA3、JCMYJSB58 聚为一个分支, 与黑井 H10 样点克隆序列 HJSS74、HJ10SS84 所聚的分支在同一个较大分支内, 该分支处于与酸微菌亚纲所在分支同一分类水平上, 我们认为这些序列代表的微生物类群同样是处于放线菌门内较高分类地位的新类群。

研究<sup>[13]</sup>发现在盐环境下有拟诺卡氏菌科(Nocardiopsaceae), 假诺卡氏菌科(Pseudonocardiaaceae)以及链霉菌科(Streptomycetaceae)的放线菌类群存在。结果显示, 在这 3 个样点中同样也分布有这些类群的放线菌。黑井 H2 样点克隆序列 HJH2SS101 与 *Nocardiopsis kunsanensis* 同源性为 99%; 黑井 H10 样点克隆序列 HJ10SSa66 与 *Nocardiopsis halotolerans* 同源性为 99%; 江城样点克隆序列 JCMYJSC30 与 *Streptomonospora salina* 同源性为 98%。黑井 H2 样点克隆序列 HJ10SSa46 与 *Pseudonocardia saturnea* 同源性为 95%; 黑井 H2 样点克隆序列 HJH2SS55 与 *Saccharopolyspora spinosa* 同源性为 99%, 未发现江城样点有克隆属于假诺卡氏菌科类群。同样, 黑井 2 个样点均有链霉菌科类群的克隆, 但江城样点没有发现属于链霉菌类群的克隆。结果预示江城和黑井两地盐矿中放线菌类群组成可能存在差异性。

### 2.3 多样性指数分析

通过统计学方法, 对黑井和江城盐矿未培养放线菌 16S rRNA 基因文库进行分析。稀有度分析(Rarefaction analysis)作为一种统计分析物种多样性指数广泛应用到分析微生物多样性研究中。用稀有度统计方法分析江城黑井 3 个 16S rRNA 基因文库中 469 个克隆的多样性(图 2)。结果显示, 黑井 H2 样点和江城样点 OTUs 已趋近于各自的曲线饱和度,

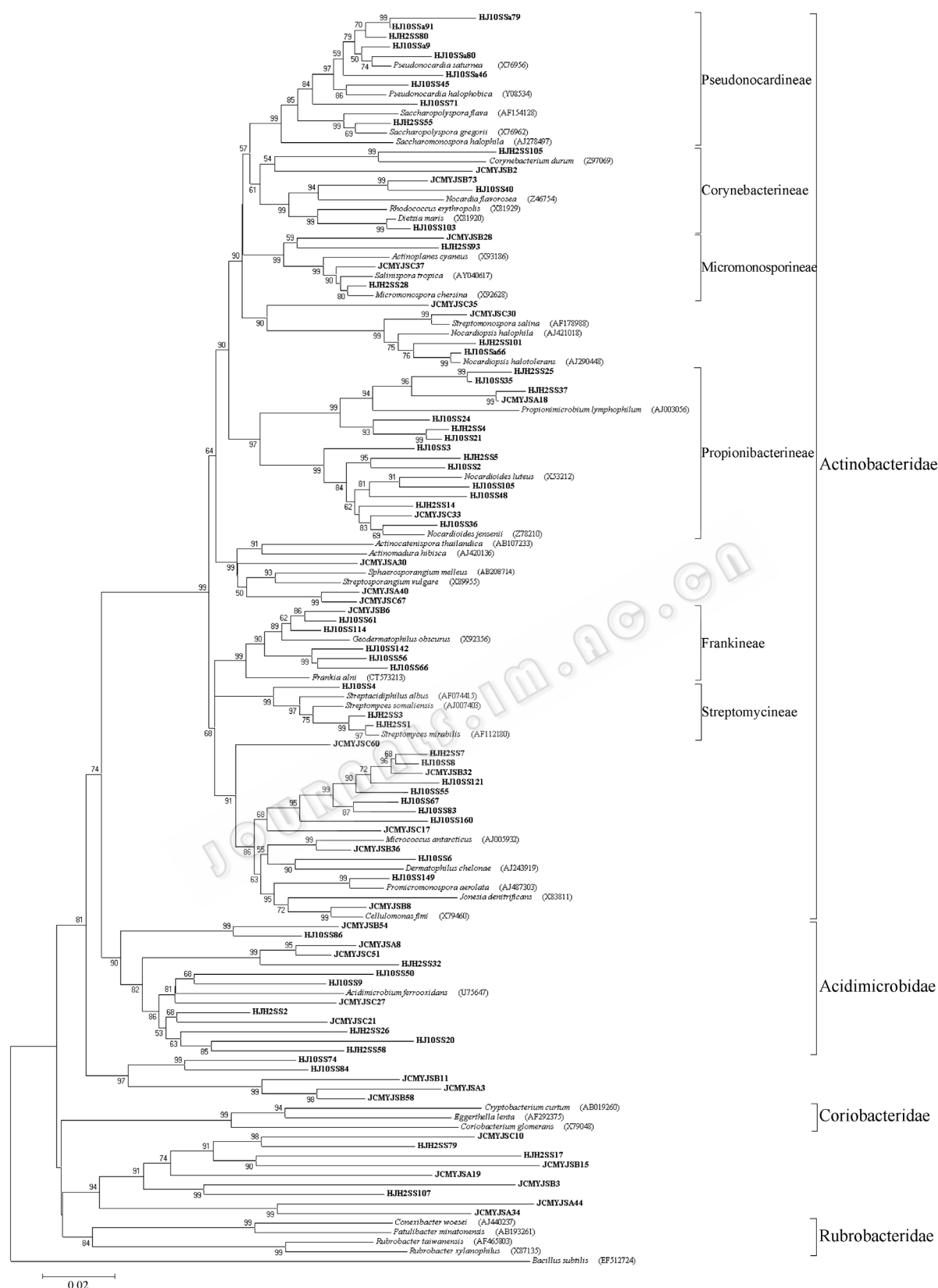


图1 黑井和江城盐矿环境放线菌类群 16S rRNA 基因系统发育树  
Fig.1 Phylogenetic tree based on actinobacterial 16S rRNA gene partial sequences from Jiangcheng and Heijing saline mines

Note: This study is coded as follows for the example of HJ10SS86. HJ: Location of Heijing brine pit; 10: No.10 sample; SS: Soil sample; 86: Clone number

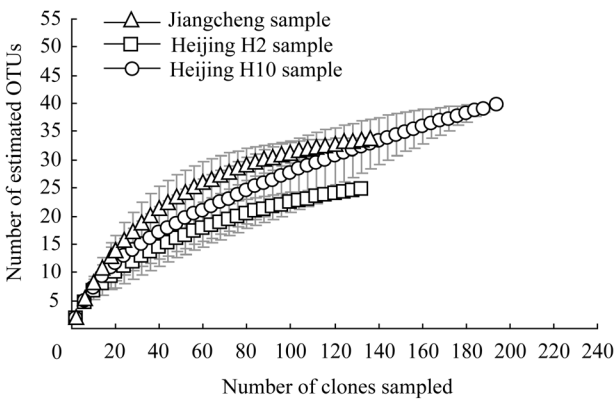


图2 江城黑井3个样点放线菌稀有度曲线  
Fig. 2 Rarefaction curves for actinobacterial OTUs of 16S rRNA gene clones of different sample

黑井 H10 样点的 OTUs 没有达到饱和, 检测 469 个克隆不能获得完整的多样性数据。

使用 SPADE 分析软件比较黑井江城 3 个样点的生物多样性指数(表 1)。黑井 H2 样点、黑井 H10 样点和江城样点的物种丰度(Species Richness)分别为 34.7、165.0、38.4; 香农指数分别为 2.702、3.129、3.377; 辛普森指数分别约为 0.12、0.08、0.05。从结果可看出, 在物种丰度上, 黑井 H10 样点较为丰富; 香农指数和辛普森指数显示江城样点多样性较为丰富。但综合多样性统计和系统发育分析数据, 黑井 H10 样点的放线菌未培养多样性要比其他两个样点的丰富。

表 1 比较 3 个样点放线菌多样性指数							
Table 1 Comparison of actinobacterial diversity index of 3 samples							
Diversity estimate							
Samples	No. of OTUs	Species Richness		Shanno Index		Simpson Index	
		ACE-1	95% CIs	Chao& Shen	95% CIs	MLE	95% CIs
Heijing H2	25	34.7	(27.3, 65.3)	2.702	(2.437, 2.967)	0.12018	(0.07732, 0.16304)
Heijing H10	40	165.0	(81.5, 416.7)	3.129	(2.840, 3.418)	0.08293	(0.05183, 0.11403)
Jiangcheng	34	38.4	(35.1, 51.9)	3.377	(3.217, 3.536)	0.05057	(0.04050, 0.06063)
CIs: Confidence interval							

3 讨论

高盐环境中存在着丰富的微生物资源, 研究人员通过分子生物技术及纯培养分离技术, 不断认识高盐极端环境中的细菌和嗜盐古菌类群的多样性。目前由于放线菌资源的广泛应用, 高盐环境中的放线菌资源调查和应用日益得到重视。江城、黑井盐矿分属云南不同区域的含盐区, 盐成分组成亦不相同且两地相距 300 km, 云南特殊的地理环境和山地特征使两个盐矿生境处于同一种生态环境类型, 但两者间微生物物种交流受地理隔离, 各自盐矿生境相对稳定, 我们预测两地放线菌群落组成应有地域性。但结果显示, 两地高盐环境下放线菌未培养群落组成大致相当, 虽在不同科属级别分类单元上有较小差异, 但有共同的放线菌门内类群组成。比较两地盐矿未培养放线菌类群物种多样性指数, 显示两地放线菌物种丰富度也较为相似。

本研究通过免培养法分析显示云南江城和黑井盐矿矿土中存在丰富的放线菌多样性, 所得到的

OTUs 存在于放线菌门中放线菌亚纲(Actinobacteridae)和酸微菌亚纲(Acidimicrobidae)中, 没有发现属于放线菌门中的红色杆菌亚纲(Rubrobacteridae)和科里氏杆菌亚纲(Coriobacteridae)的 OTUs。说明放线菌亚纲和酸微菌亚纲放线菌可能是云南盐矿土壤中的主要类群。目前从高盐环境中使用纯培养技术获得的放线菌主要集中在放线菌目(Actinomycetales)中的几个科。目前没有报道过在高盐极端环境中发现酸微菌亚纲(Acidimicrobidae)类群放线菌, 但在江城和黑井盐矿土中均发现有属于该亚纲的序列, 且序列间亲缘性相距较远并获得高自展值分支的支持。这可能表明在高盐环境中可能存在酸微菌亚纲的一些新类群。人们对存在于高盐环境下的嗜盐放线菌生理和适应环境的机制仍知之甚少, 利用分子生物学手段探测极端环境微生物资源, 可以为我们更深入了解及开发利用这些特殊形态的生命形式提供指导材料。研究同时还发现有部分 OTUs 在系统发育树上处于与放线菌门下现有的亚纲同等分类地位上的分支。说明云南盐矿土中可能存在不同

分类级别的放线菌新类群, 这些新类群不仅是属或科一级新单元, 有些可能是亚纲级的高级分类单元。这些结果可以作为数据参考, 使我们更深入地了解放线菌资源。

随着统计学方法应用到环境放线菌多样性的研究中<sup>[12,14]</sup>, 多种分析手段可以使我们获得更多的数据, 从而使我们更好的认识环境中的放线菌群落组成和分布状况, 并可拓展到生物多样性保护、生物地理学和多样性预测等方面。然而, 要准确预测和分析环境中的微生物多样性仍然是很困难的工作。近年来基因组学和现代分子技术的成熟, 逐渐渗透到有关生命科学的整个领域, 也为微生物生态学提供了新的研究方法和机遇<sup>[15]</sup>。16S rRNA 基因序列分析、DNA-DNA 杂交、核酸指纹图谱以及宏基因组学等分子技术, 可以克服传统纯培养技术的不足, 提供了一种探知微生物多样性结构和功能基因组的方法。当然, 要真正研究环境中微生物多样性结构, 只依靠未培养技术仍然是不够的, 需要与纯培养、原位杂交等技术结合使用, 才能客观反映环境中微生物多样性信息<sup>[16,17]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Demirjian DC, Moris-Varas F, Cassidy CS. Enzymes from extremophiles. *Curr Opin Biotechnol*, 2001, **5**: 144–151.
- [2] Jiang H, Dong H, Zhang G, *et al.* Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Appl Environ Microbiol*, **72**: 3832–3845.
- [3] 刘会强, 张立丰, 韩 彬, 等. 嗜盐菌的研究新进展. 新疆师范大学学报(自然科学版), 2005, **24**(3): 84–88.
- [4] Mancinelli RL, Fahlen TF, Landheim R, *et al.* Brines and evaporites: analogs for Martian life. *Adv Space Res*, 2004, **33**: 1244–1246.
- [5] 刘志恒. 放线菌——微生物药物的重要资源. 微生物学通报, 2005, **32**(6): 143–145.
- [6] Dunber J, Barns SM, Ticknor LO, *et al.* Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soil. *Appl Environ Microbiol*, 2002, **68**: 3035–3045.
- [7] Torsvik V, Ovreas L, Thingstad TF. Prokaryotic diversity magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, 2002, **296**: 1064–1066.
- [8] 赵 勇, 周志华, 李 武, 等. 土壤微生物分子生态学研究总 DNA 的提取. 农业环境科学学报, 2005, **24**(5): 854–860.
- [9] Jizhong Zhou, Mary Ann Bruns, James M Tiedje. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 316–322.
- [10] Colin R Jackson, Jenneifer P Harper, Dache Willoughby, *et al.* A simple, efficient method for the separation of Humic substances and DNA from environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 4993–4995.
- [11] Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, *et al.* New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ Microbiol*, 2003, **5**: 828–841.
- [12] Stach JE, Maldonado LA, Masson DG, *et al.* Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**: 6189–6200.
- [13] 李文均, 唐蜀昆, 王 栋, 等. 新疆青海中度嗜盐放线菌生物多样性初步研究. 微生物学报, 2004, **44**(1): 1–7.
- [14] Stach JE, Bull AT. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **87**: 3–9.
- [15] 叶姜瑜, 罗固源. 未培养微生物的研究与微生物分子生态学的发展. 微生物学通报, 2004, **31**(5): 111–115.
- [16] Head IM, Saunders JR, Pickup RW. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultured microorganisms. *Microbial Ecology*, 1998, **35**: 1–21.
- [17] 李沁元, 崔晓龙, 张东华, 等. 云南腾冲热海三热泉细菌多样性的研究. 微生物学通报, 2004, **31**(5): 49–54.