

研究报告

新疆红井子盐碱土壤非培养放线菌多样性

贾晓宇^{1,2} 贺江舟¹ 关统伟¹ 孙红专¹ 夏占峰² 张利莉^{1*}(1. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用 省部共建国家重点实验室培育基地
新疆 阿拉尔 843300)

(2. 塔里木大学 生命科学学院 新疆 阿拉尔 843300)

摘要: 【目的】研究新疆红井子盐碱土壤中的放线菌物种多样性。【方法】应用基于 16S rRNA 基因序列系统发育分析的免培养方法进行放线菌物种多样性分析。利用放线菌特异性引物,以土壤样品总 DNA 为模板,扩增 16S rRNA 基因,构建 16S rRNA 基因克隆文库,并对文库中的插入序列进行 RFLP 分析。【结果】随机挑选的 246 个阳性克隆通过酶切筛选出 61 个不同图谱的重组克隆并测序。分析结果显示这 61 个克隆序列分属于 42 个 OTUs,分布于放线菌纲(Actinobacteria)的放线菌亚纲(Actinobacteridae)、酸微菌亚纲(Acidimicrobidae)和红色杆菌亚纲(Rubrobacteridae);该环境中有 71.4% 的序列与已有效发表菌株的序列相似性小于 97%,代表着放线菌新类群,其中部分序列形成了几个独立的进化分支,可能代表更高级的新分类单元。【结论】红井子土壤中的放线菌组成具有丰富的多样性,并有新放线菌分类单位的潜在资源,值得进一步进行开发研究。

关键词: 红井子, 盐碱土, 放线菌多样性, 系统发育, 免培养方法

Actinobacterial diversity of a soil sample from Hongjingzi in Xinjiang by using culture-independent method

JIA Xiao-Yu^{1,2} HE Jiang-Zhou¹ GUAN Tong-Wei¹ SUN Hong-Zhuan¹
XIA Zhan-Feng² ZHANG Li-Li^{1*}

(1. State Key Laboratory Cultivation Base of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

(2. College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to investigate the actinobacteria diversity of

基金项目: 国家 973 计划前期研究专项(No. 2010CB134505)

*通讯作者: Tel: 86-997-4682559; Fax: 86-997-4681612; ✉: zhang63lyly@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-10-19; 接受日期: 2011-12-22

the saline-alkali soil from Hongjingzi located in XinJiang Province. **[Methods]** The diversity of actinobacteria in this soil was investigated by using culture-independent method based on phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences. The specific primers for the class Actinobacteria were used to amplify the partial 16S rRNA gene, and then clone library for the soil sample was constructed. A total of 246 positive clones chosen randomly from the clone library were digested with *Hae* III for RFLP analysis. **[Results]** Among of them, 61 different clones selected were sequenced. The analysis of 16S rRNA gene sequences showed that the clone sequences went back to 42 OTUs and belonged to subclasses Actinobacteridae, Acidimicrobidae and Rubrobacteridae respectively. The 71.4% of the detected sequences from this soil was less than 97% similarity to the published sequences, which might represent new taxa. Some sequences, which formed several distinct clades in phylogenetic tree may represent new taxonomical groups of actinobacteria. **[Conclusion]** These results indicate that the soil from Hongjingzi region be abundant actinobacteria, including large number of unknown actinobacterial taxa, which would be further explored.

Keywords: Hongjingzi, Saline-alkali soil, Phylogenetic analysis, Actinobacterial diversity, Culture-independent method

放线菌是一类具有重要应用价值的微生物,在抗生素和酶制剂产业中具有重要地位^[1-2]。近年来,随着研究方法的改进,人们从极端环境中发现越来越多的微生物新种类及其多种活性物质^[3-5]。其中放线菌更是因其具有特殊的生理机制及代谢产物,可能包含着更丰富的未知类群,对于认识生命的极限及其与环境的相互作用规律等都具有极为重要的科学意义和开发价值,因此受到越来越多的关注。盐碱化作为典型的极端环境,国内外学者对其中放线菌产抗生素等方面都进行了相关的研究^[6-7]。

新疆红井子位于哈密地区巴里坤哈萨克自治县境内,由于极端干旱的气候、高盐土壤母质、三山(巴里坤山、莫钦乌拉山、东准噶尔断块山)夹两盆(巴里坤盆地、三塘湖盆地)的地形特点使河流携带盐分积累等自然原因形成了稳定的高盐生态环境,盐碱化非常严重^[8],属于重盐碱地区,严重影响了农业生产,使得盐碱化已成为土地退化的主要原因之一。因此,红井子土壤微生物资源的全面挖掘,认识盐碱环境微生物的物种多样性,对于土地开发和农业持续发展具有重要

的意义,为这一类极具开发潜力的微生物积累种质资源和基因资源,也可进一步为盐碱化环境的生态修复、极端环境放线菌基因资源的保护和利用提供基本保障。

传统的分离纯化培养技术为人们认识微生物多样性提供了帮助,但由于培养基质、条件及技术的限制,仍无法从环境中得到所有微生物的纯培养菌株,造成对环境微生物多样性的低估,据估计大约有 99% 的微生物不可培养^[9]。免培养技术绕过了这一瓶颈,能够快速全面地调查环境中微生物的多样性,尤其是能获得难于分离培养微生物的信息。本研究利用免培养的这一优势,调查红井子盐碱土壤中的放线菌群落组成,挖掘纯培养难以获得的生物信息,为指导红井子放线菌的分离培养提供一定的参考资料,为保护和开发利用该生境中放线菌资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集: 2010 年 11 月,从新疆哈密红井子(92°10'E, 43°77'N)采集土壤样品。采样点海

拔 2103.9 m, 取样深度为 0–30 cm, 样品采集后装于无菌的样品盒中, 低温运抵实验室后立即进行免培养分析实验。

1.1.2 主要试剂和仪器: E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 购自上海叶舟生物科技有限公司; *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、*Hae* III 限制性内切酶购自广州东盛生物科技有限公司; DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; PCR 仪、凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司; 离心机购自德国 Eppendorf 公司; 电泳仪购自北京六一仪器厂; 超净工作台和培养箱购自上海博讯实业有限公司。

1.2 PCR 扩增

采用 E.Z.N.A.® Soil DNA Kit 从红井子土壤样品中提取基因组 DNA。用放线菌特异性引物^[10] (S-20: 5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3'; A-19: 5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3') 对放线菌 16S rRNA 基因部分序列进行 PCR 扩增。PCR 反应条件参照 Stach^[10]的方法进行, 扩增体系为 50 μ L, 扩增片段大小约 640 bp。

1.3 克隆文库构建及系统发育分析

1.3.1 克隆文库的构建^[11]:按照 DNA 胶回收试剂盒说明将 PCR 扩增的目的条带切胶回收纯化。纯化后的 PCR 产物通过 T4 DNA 连接酶与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞。通过蓝白斑筛选, 将白色克隆转接于 96 孔细胞培养板中, 置于 -40 °C 保藏。

1.3.2 克隆文库的检验及 RFLP 分析:对文库中的克隆子用 M13 引物(M13-F: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'; M13-R: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3')进行菌落 PCR, 以检测是否为阳性克隆^[12]。菌落 PCR 产物用限制性内切酶 *Hae* III 进行酶切。酶切产物用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 选择 RFLP 图谱中条带有差异的克隆送北京奥科鼎盛生物技术有限责任公司测序。

将测序获得的序列通过 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 与 GenBank 数据库中已知序列进行比对分析, 再用 MEGA 4.1 软件进行多重序列比对。以 99.0% 相似性为标准划分不同的操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU)^[13]。用 Analytic Rarefaction 软件绘制克隆文库的稀有度曲线(Rarefaction curve), 以检验文库的代表性。使用软件 SPADE (Species prediction and diversity estimation) 通过 Estimated sample coverage、Shannon Index、Simpson Index、Species richness 等相关指数进行红井子样点克隆文库的微生物多样性评价分析。

1.3.3 系统发育分析:每个 OTU 选取一条代表序列, 通过 BLAST 找到 GenBank 数据库中与之相近的已知放线菌类群的序列并下载。将 OTU 的代表序列和下载的序列用 MEGA 4.1 软件进行多重比对, 采用 MEGA 4.1 构建系统发育树。同时, 用 Bootstrap 来检验评估系统进化树的拓扑结构的稳定性, 自展值(Bootstrap value)为 1 000^[14]。

2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因文库构建及多样性指数分析

2.1.1 16S rRNA 基因文库构建:提取土壤基因组 DNA 经过 PCR 扩增、纯化、连接、转化、菌落 PCR 后, 共筛选获得 246 个阳性克隆。用 *Hae* III 酶切菌落 PCR 产物电泳得酶切图谱(图 1), 通过合并挑取 61 个克隆送样测序。测序结果经过序列比对, 共归于 42 个 OTUs, 序列 GenBank 注册号为 JF916584–JF916598、JF916600、JF916603、JF916605、JF916606、JF916609、JF916614、JF916615、JF916617、JF916618、JF916619、JF916621–JF916624、JF916627、JF916628、JF916629、JF916631–JF916636、JF916640、JF916642、JF916643 和 JF916645。

2.1.2 样品放线菌多样性指数分析: 对克隆的测序结果应用 RDP II 中的 Chimera Check 程序检查所获得的序列, 结果无嵌合体发现。通过统计学方法, 分析红井子土壤样品中免培养放线菌 16S rRNA 基因文库, 用稀有度统计方法分析所构建 16S rRNA 基因克隆文库中 246 个克隆的多样性, 得到 Rarefaction curve 图(图 2)。从图 2 中可以看出, LibraryH 曲线已趋于平缓, 根据 Kemp^[15]的研

究结论, 即可认为库容(Library size)已经足够, 涵盖了供试样点放线菌的绝大多数物种。

使用 SPADE 分析软件对红井子土壤样品进行放线菌多样性指数分析, 结果如表 1 所示。在可信区间为 95%的情况下, 其样品覆盖率估计(C)为 97.6%, 样点的物种丰度(Species richness)为 44.8; 香农指数(Shannon Index)为 3.513; 辛普森指数(Simpson Index)为 0.041 79。

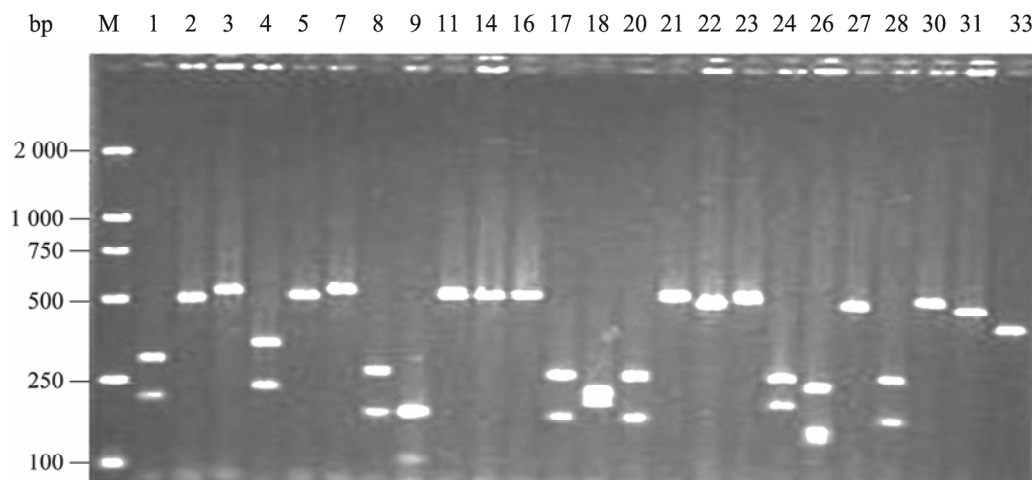


图 1 部分克隆子插入片段的 *Hae* III 酶切电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of insert fragment of part clones digested with *Hae* III

注: M: DNA marker DL2000; 1-35: 克隆子编号.

Note: M: DNA marker DL2000; 1-35: Number of clones.

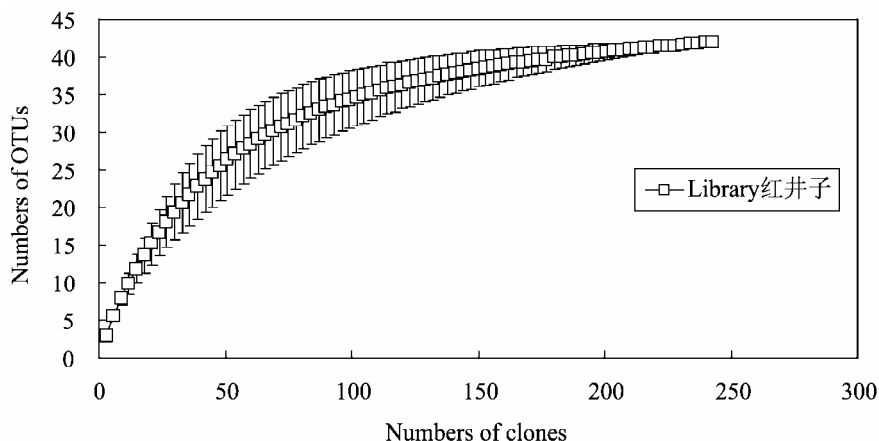


图 2 红井子土壤样品放线菌稀有度曲线

Fig. 2 Rarefaction curve for Hongjingzi Soil sample OTUs of 16S rRNA gene clones

Note: Error bars are standard deviations.

表 1 红井子土壤样品中放线菌多样性指数比较
Table 1 Comparison of actinobacterial diversity index of Hongjingzi Soil sample

样品 Sample	Number of OTUs	C	多样性统计 Diversity estimate					
			物种丰度 Species richness		香农指数 Shannon Index		辛普森指数 Simpson Index	
			FSR	95% CIs	Chao & Shen	95% CIs	MLE	95% CIs
Hongjingzi	42	0.976	44.8	(42.7, 53.8)	3.513	(3.346, 3.680)	0.041 97	(0.028 72, 0.055 22)

Note: CIs: Confidence interval; MLE: Maximum likelihood estimator; Chao & Shen: Based on Horvitz-Thompson estimator and sample coverage method; FSR: Estimation of species richness; C: Estimated sample coverage.

红井子土样的覆盖率(C)统计为 97.6%, 说明该土壤样品中 97.6% 的放线菌物种都已经被克隆获得。因此, 文库基本上包含了环境中绝大多数放线菌的种类, 能够代表该样点的物种多样性。物种丰度是生物多样性研究的一个重要内容^[16], 指的是生物群落中物种发现的数量, 它反映了该环境样品中放线菌的多样性情况。红井子样点的物种丰度(Species richness)为 44.8, 物种多样性比较丰富。香农指数能综合反映丰富度和均一度, 数值越高说明样品中微生物的多样性越丰富^[17]。红井子 16S rDNA 基因文库的 Shannon Index 为 3.513, 相对于关统伟等^[18]研究的新疆硝尔库勒盐湖的要高(3.283), 说明红井子盐碱土中放线菌多样性极为丰富。辛普森指数越大, 物种均匀性越好。红井子样品中辛普森指数为 0.041 97, 相对于关统伟等^[18]研究的新疆硝尔库勒盐湖环境下的要稍低一些(0.079 53)。实验结果分析表明, 构建的红井子盐碱土 16S rDNA 基因文库含有丰富的放线菌多样性, 包含了该样点绝大多数放线菌的数量, 能够代表该样点放线菌的实际情况。

2.2 16S rRNA 基因序列分析

测序获得 61 个克隆的 16S rDNA 基因插入片段序列同 GenBank 数据库中已知序列进行比对, 并以 99.0% 相似性划分为一个 OTU 作为标准来分析序列信息^[13], 得到红井子土壤样点 42 个 OTUs。把 42 个 OTUs 的序列与已知放线菌类群

的有效序列共同构建系统发育树, 同时以 *Bacillus subtilis* 的 16S rDNA 基因序列作为外群(图 3)。从系统发育树可以看出这些序列代表的菌株分属于整个放线菌门(Actinobacteria)、放线菌纲中的 3 个亚纲: 放线菌亚纲(Actinobacteridae)、酸微菌亚纲(Acidimicrobidae)和红色杆菌亚纲(Rubrobacteridae), 其中在酸微菌亚纲(Acidimicrobidae)和放线菌亚纲(Actinobacteridae)分布数量居多。有 15 个 OTUs 存在于放线菌亚纲中, 分布于 4 个亚目的 8 个科中, 即假诺卡氏菌亚目(Pseudonocarineae)、微球菌亚目(Micrococccineae)、链霉菌亚目(Streptomycineae)和弗兰克氏菌亚目(Frankineae)。假诺卡氏菌亚目占到了总克隆数的 18.29%, 微球菌亚目占 11.38%, 它们属于中等数量类群。弗兰克氏菌亚目(Frankineae)和链霉菌亚目(Streptomycineae)克隆数较少, 为 4.07%, 属于数量较少的类群。其中, 微球菌亚目中所分布的属最多。酸微菌亚纲中 14 个 OTUs 的序列与 GenBank 中已知的微球菌序列相似度在 90%–97% 之间, 也可能代表酸微菌亚纲中新的类群。其余的 13 个 OTUs 属于红色杆菌亚纲, 这些序列与 GenBank 中已知的红色杆菌序列相似度都较低, 极有可能是新的放线菌类群。与红色杆菌亚纲中的克隆序列最相近的是嗜热油菌属(*Thermoleophilum*), 该属菌为专性嗜热菌^[19], 红井子夏季地面温度比较高, 为此类放线菌提供了有利的生存条件。

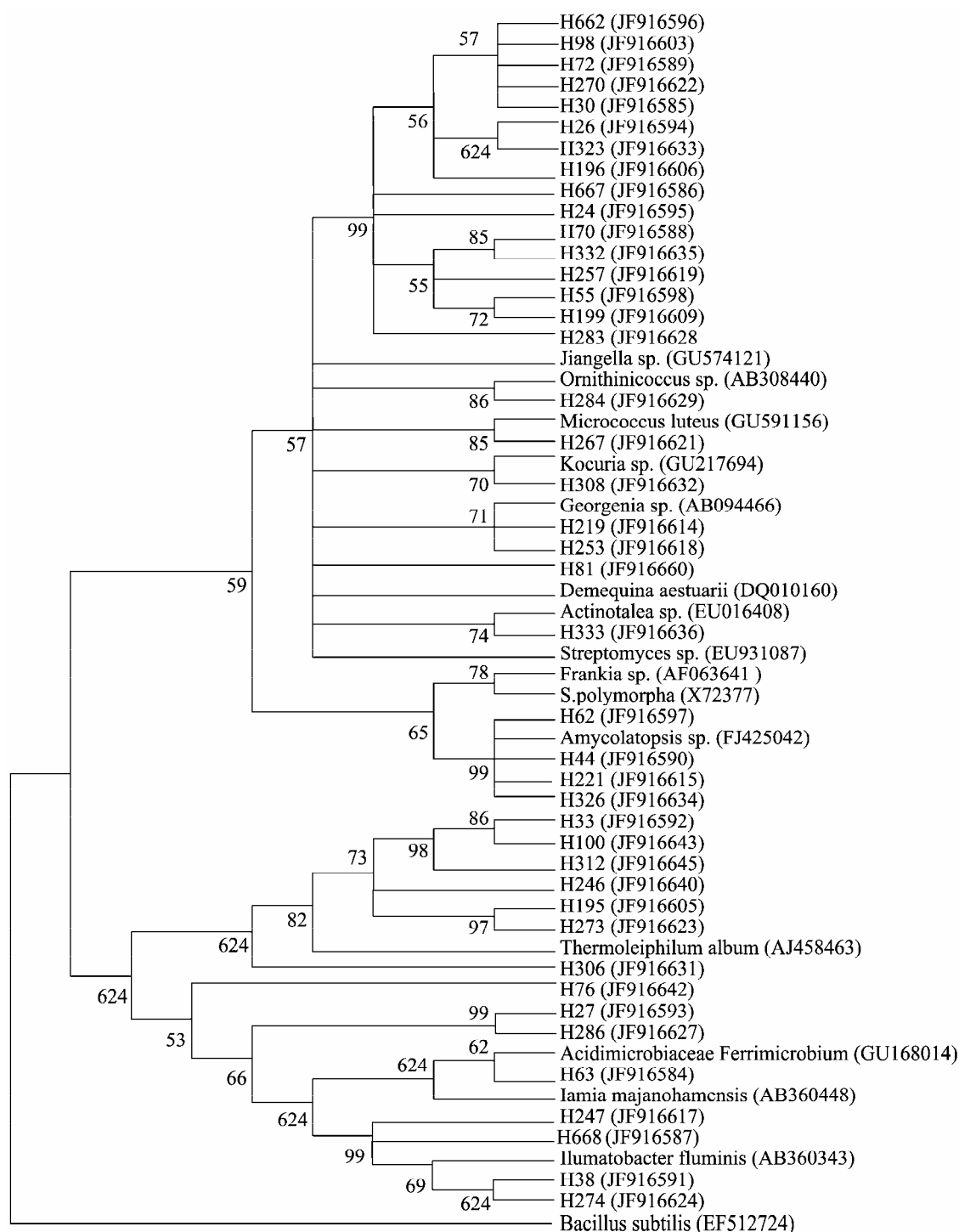


图 3 红井子土壤样品部分克隆序列与放线菌相关种构建的以 16S rRNA 基因为基础的系统发育树

Fig. 3 Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic relationships among acinobacterial 16S rRNA gene partial sequences obtained from soil sample samples of the Hongjingzi and their closely related sequences downloaded from GenBank

在测得的 42 个 OTUs 中, 71.4% 的 OTUs 与有效发表的所有类群无较近的亲缘关系, 相似性均低于 97%, 如克隆序列 H662 与 *Ferrimicrobium* (GU168014) 的相似性为 91%, 克隆序列 H24 与 *Thermoleophilum* (AJ458463) 的相似性为 84%, 克隆序列 H81 与 *Cellulomonadaceae Actinotalea* (EU016408) 相似性为 81%。它们以极高的自展值支持形成独立的大分支, 极有可能代表一个新亚目或更高级分类单元的类群。这些结果预示着红井子盐碱土壤中存在着丰富的放线菌物种多样性, 并蕴藏丰富的放线菌新类群, 这些研究结果说明新疆盐碱土壤是挖掘放线菌新物种资源的理想之地。

3 讨论

极端微生物由于其独特的生理机制、基因类型和代谢产物的特殊性使其成为一类极具开发潜力的生物资源, 是各国微生物学者研究的热点之一。红井子盐碱土的免培养分析表明存在丰富的放线菌多样性, 以及大量至今无法得到纯培养的克隆序列, 这说明盐碱化环境中存在着许多没有被人们发现的放线菌类群, 并且具有开发应用的潜力, 如能够产生利福霉素、利托菌素和抑制细菌及癌细胞等的新抗生素^[20-22]的拟无枝酸菌属 (*Amycolatopsis*) 克隆, 以及耐高温、对有机污染物有较好降解作用^[19]的嗜热油菌属 (*Thermoleophilum*) 克隆。

研究显示, 红井子土壤放线菌主要分布在放线菌亚纲和酸微菌亚纲中, 但有少数分布在红色杆菌亚纲中。红色杆菌亚纲属于耐高温放线菌类群, 可能与该地区独特的夏季高温气候密切相关。与采用相同方法研究的新疆硝尔库勒盐湖^[18]、云南江城、黑井两个盐矿^[23]和新疆于田盐池^[24]等盐环境进行比较, 结果发现这些盐环境放线菌类群在大的分类地位上虽然相似, 但彼此间仍有

差异, 出现这种差异的原因可能是不同的生态环境决定了其微生物群落组成也不尽相同, 土壤微生物的多样性存在时空特异性。有研究表明, 土壤类型很大程度上决定了土壤微生物群落组成和群落物种丰富度^[25]。

高盐环境中蕴藏着丰富的放线菌类群, 怎样将它们分离获得纯培养成为我们面临的关键问题。通过免培养获得的物种多样性信息可以指导我们有方向性地改良或设计培养基, 优化培养条件, 以期发掘更多潜在的放线菌资源, 从而更好地利用这些不可培养微生物资源, 为生物技术的发展提供新材料。

参 考 文 献

- [1] 姜成林. 放线菌资源开发利用[J]. 工业微生物, 1989, 19(6): 31-35.
- [2] Takahashi Y, Omura S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2003, 49(3): 141-154.
- [3] 顾觉奋, 罗学刚. 极端微生物活性物质的研究进展[J]. 中国天然产物, 2003, 1(4): 252-256.
- [4] Podarl M, Reysenbach AL. New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17(3): 250-255.
- [5] 姜怡, 李文均, 徐平, 等. 盐碱环境放线菌多样性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 191-195.
- [6] Mikami Y, Miyashita K, Arai T. Alkalophilic actinomycetes[J]. Actinomycetes, 1986, 12(19): 176-191.
- [7] 唐蜀昆, 李文均, 张永光, 等. 嗜盐放线菌生物学特性初步研究[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 15-19.
- [8] 陈小兵, 杨劲松, 刘春卿, 等. 大农业条件下新疆土壤盐碱化及其调控对策[J]. 土壤, 2007, 39(3): 347-353.
- [9] Amann RI, Lidwig W, Schleifer KH. Phylogenetic

- identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1995, 59(1): 143–169.
- [10] Stach JEM, Maldonado LA, Ward AC, et al. New primers for the class *Actinobacteria*: application to marine and terrestrial environments[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(10): 828–841.
- [11] Jiang HC, Dong HL, Zhang GX, et al. Microbial diversity in water and sediment of lake Chaka, an Athalassohaline Lake in northwestern China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3832–3845.
- [12] 图雅, 朱伟云, 陆承平. 东北虎粪细菌区系的16S rRNA 基因序列分析[J]. *微生物学报*, 2005, 45(5): 671–674.
- [13] Stach JEM, Maldonado LA, Masson DG, et al. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(10): 6189–6200.
- [14] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783–791.
- [15] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47(2): 161–177.
- [16] He JS, Ma KP. Species diversity//Jiang ZG, Ma KP, Han XG, eds. *Conservation Biology*[A]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Press, 1997: 20–33.
- [17] Cui ZL, Liu J, Cao H, et al. Comparison of bacterial diversity from a rice soil in Jiangxi Province by cultivation and uncultivation method[J]. *Soils*, 2008, 40(6): 903–908.
- [18] 关统伟, 吴晋元, 吴晓阳, 等. 硝尔库勒湖沉积物中非培养放线菌多样性[J]. *微生物学报*, 2008, 48(7): 851–856.
- [19] Yakimov MM, Lünsdorf H, Golyshin PN. *Thermoleophilum album* and *Thermoleophilum minutum* are culturable representatives of group 2 of the *Rubrobacteridae* (*Actinobacteria*)[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(2): 377–380.
- [20] Lee SD, Hah YC. *Amycolatopsis albidoflavus* sp. nov. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(2): 645–650.
- [21] 吴云, 张月琴, 王华敦. 几株 *Amycolata* 和 *Amycolatopsis* 属菌的分离和鉴别[J]. *中国抗生素杂志*, 1993, 18(4): 250–253.
- [22] Kunimoto S, Lu J, Esumi H, et al. Kigamicins, novel antitumor antibiotics. I. Taxonomy, isolation, physico-chemical properties and biological activities[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2003, 56(12): 1004–1011.
- [23] 吴晋元, 职晓阳, 李岩, 等. 云南江城和黑井盐矿沉积物未培养放线菌多样性比较[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(10): 1550–1555.
- [24] 关统伟, 赵珂, 夏占峰, 等. 新疆于田盐池放线菌群落结构[J]. *微生物学通报*, 2009, 36(4): 515–521.
- [25] Girvan MS, Bullimore J, Pretty JN, et al. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(3): 1800–1809.