

云南干热环境可培养高温放线菌多样性及 产纤维素酶活性评价

张敬^{1,2} 何伟宏² 唐蜀昆¹ 周恩民¹ 明红^{1,3} 李帅⁴
聂国兴⁴ 李文均^{1,3*}

- (1. 云南大学 云南省微生物研究所 西南微生物多样性教育部重点实验室暨云南省高等学校放线菌资源与利用重点实验室 云南 昆明 650091)
- (2. 中国科学院南海海洋研究所 海洋环境工程中心 广东 广州 510301)
- (3. 中国科学院新疆生态与地理研究所 中科院干旱区生物地理与生物资源重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830011)
- (4. 河南师范大学 水产学院 河南 新乡 453007)

摘要: 【目的】探索云南东川干热河谷、元谋土林以及昆明周边高温堆肥、热泉等环境可培养高温放线菌的多样性及其产纤维素酶的潜力。【方法】利用稀释涂布平板法从采集于上述环境的样品中分离得到菌株 500 余株, 通过形态去重复后对 300 余株进行 16S rRNA 基因测序分析, 并对获得的菌株利用刚果红染色的方法进行纤维素酶活性初步筛选。【结果】分离到的菌株共分布于放线菌纲下 9 个亚目 15 个科 33 个属, 其中候选新属 2 个、候选新种 3 个。451 株菌的纤维素酶筛选结果显示 57% 具有纤维素酶活性, 其中链霉菌、小单孢菌、野野村氏菌在纤维素酶活性菌株中占较大比例。【结论】云南干热环境下蕴含着丰富的放线菌资源, 纤维素酶初步筛选显示出了良好的降解活性, 为下一步的深入研究提供良好的菌源。

关键词: 干热环境, 高温放线菌, 多样性, 纤维素酶

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31070007); 云南省高等学校重点实验室基金项目(No. X3112007); 国家大学生创新性实验计划项目(No. 201210476060)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-871-5033335; ✉: liact@hotmail.com, wjli@ynu.edu.cn

收稿日期: 2012-07-24; 接受日期: 2012-11-19

Diversity of culturable thermophilic actinobacteria and their producing cellulase activity in several dry-hot environments in Yunnan Province

ZHANG Jing^{1,2} HE Wei-Hong² TANG Shu-Kun¹ ZHOU En-Min¹
MING Hong^{1,3} LI Shuai⁴ NIE Guo-Xing⁴ LI Wen-Jun^{1,3*}

(1. Key Laboratory for Actinobacterial Resources and Utilization of Yunnan Universities and Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(2. Marine Environmental Engineering Center, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, Guangdong 510301, China)

(3. Key Laboratory of Biogeography and Bioresource in Arid Land, Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

(4. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

Abstract: [Objective] This study focus on the diversity of culturable thermophilic actinobacteria isolated from Dong Chuan dry hot river valley, Yuan Mou soil forests, and some high-temperature composts, hot springs nearby Kunming in Yunnan province, and exploring their cellulase producing activity. [Methods] Over five hundreds strains were isolated by the plate dilution method. After dereplication and removing the similar strains based on colony-characteristics, more than three hundreds strains were sequenced for further research. The cellulase producing activity of 451 strains were further detected by Congo red solution. [Results] BLAST analysis of the partial 16S rRNA gene sequences revealed that these strains have the highest similarity with 33 described genera, which were distributed in 15 families of 9 suborders. Among of them, five actinobacterial strains were selected as potential candidates for further polyphasic taxonomic research, based on the lower similarities of 16S rRNA gene sequences. Cellulase screening results showed that the positive rate was about 57% in total 451 strains. Most of them were distributed in three genera of *Streptomyces*, *Micromonospora* and *Nonomuraea*. [Conclusion] There are considerable diversity of culturable thermophilic actinobacteria in dry hot environments of Yunnan province. Meanwhile, these strains exhibited higher positive rate and stronger activity of cellulase, which will provide high-quality experimental materials for future research.

Keywords: Dry hot environment, Thermophilic actinobacteria, Biodiversity, Cellulase

自 Brock 1969 年从美国黄石国家公园的温泉中分离到最适生长温度高达 80 °C 的水生栖热菌 (*Thermus aquaticus*) 以后, 高温菌就引起微生物

学家的极大关注。尤其是其后发现的水生栖热菌产生的 DNA 聚合酶 (*Taq* 酶), 并实现了 DNA 的体外 PCR 扩增, 极大地促进了分子生物学的发展^[1]。

目前所发现的高温微生物大多数为细菌和古菌, 有少数真菌, 但真菌的最高生长温度不超过 65 °C^[1], 也未发现最适生长在 75 °C 以上的放线菌类群^[2]。本文中涉及的高温放线菌(Thermophilic actinobacteria)并非一个分类学上的概念, 它一般是指放线菌门中生长温度在 45 °C–65 °C 之间的一个生态群。早在 19 世纪下半叶放线菌刚刚被发现不久, 人们就分离到一些高温放线菌和链霉菌的高温菌群。Gadkari 等从燃烧过的木炭堆里分离出一株嗜热的, 并能氧化 CO₂ 和 H₂ 的专性化能无机营养型的高温放线菌——热自养链霉菌(*Streptomyces thermoautotrophicus*)^[3]。

目前主要在以下属中发现较多的高温放线菌菌株: 高温单孢菌属(*Thermomonospora*)^[4–5]、高温双歧菌属(*Thermobifida*)^[4]、高温多孢菌属(*Thermopolyspora*)、糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)^[6]、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)^[7]、链霉菌属(*Streptomyces*)^[8]、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、类诺卡氏菌属(*Nocardoides*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)等。

对高温微生物的工业应用主要是高温酶, 高温微生物是开发各种热稳定酶的优良资源。而耐高温纤维素酶尤其受到科学家的青睐, 因为纤维素是地球上含碳量最丰富的多聚糖, 使用产耐热纤维素酶的高温菌, 对高纤维素原料进行酶解糖化生成葡萄糖^[1], 能够减缓全球性能源危机。

本文以高温环境放线菌资源为研究对象, 通过经典的纯培养和分子生物学方法, 探索云南几种高温环境中放线菌资源分布情况及其纤维素酶的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 样品

云南省东川干热河谷(Dry hot river valley,

DHRV)土样(表 1), 楚雄彝族自治州元谋土林(Soil forest, SF)表层土样(表 1)以及昆明郊区沙朗乡堆肥样。昆明沙朗乡堆肥样品采集于 2008 年 10 月, 东川干热河谷与元谋土林样品采集与 2009 年 5 月。采集的样品于无菌纸封袋中保存。

1.2 分离培养基

(1) Gauze No.1 (g/L): Sol starch 20.0, KNO₃ 1.0, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, FeSO₄ 0.01, Agar 20.0, pH 7.2–7.4;

(2) 改良 ISP 5 (g/L): L-asparagine 1.0, Glycerol 10.0, K₂HPO₄ 1.0, Agar 20.0, pH 7.2–7.4;

(3) HV (g/L)^[9]: Humic acid 1.0, Na₂HPO₄ 0.5, KCl 1.7, MgSO₄·7H₂O 0.05, FeSO₄·7H₂O 0.01, CaCl₂ 1.0, Vitamin mixtures 3.75 mg (containing 0.5 mg each of thiamine-HCl, riboflavin, niacin, pyridoxine-HCl, inositol, calcium pantothenate and p-aminobenzoic acid and 0.25 mg biotin), Agar 20.0, pH 7.2;

(4) R8 (g/L): MgCl₂·7H₂O 5.1, Yeast extract 5.0, CaCl₂·2H₂O (5 mol/L) 10.0 mL, L-proline (20%, W/V) 15.0 mL, NaOH (1 mol/L) 7.0 mL, Agar 20.0, pH 7.0–7.4;

(5) CCMS (g/L)^[10]: Cellulose 10.0, Casein 0.3, KNO₃ 0.2, MgSO₄·7H₂O 0.05, K₂HPO₄ 0.2, CaCO₃ 0.02, FeSO₄ 1.0, Agar 20.0, pH 7.5;

(6) GTY (g/L)^[11]: Glucose 1, Tryptone 0.5, Yeast extract 2.0, CaCO₃ 1.0, Agar 20.0, pH 自然;

(7) GYM (DSMZ medium 65, g/L): Glucose 4.0, Yeast extract 4.0, Malt extract 10.0, CaCO₃ 2.0, Agar 20.0, pH 7.2;

(8) CM (g/L)^[12]: Galcium malic acid 10.0, Glycerol 10.0, NH₄Cl 0.05, K₂HPO₄ 0.5, Agar 20.0; 自行设计培养基 2 种:

(9) TPA (g/L): Trehalose 1.0, (NH₄)₃PO₄ 4.0, L-proline 1.0, NaCl 1.0, FeCl₂ 1.0, FeSO₄ 0.5, CaCl₂·2H₂O 0.5, K₂HPO₄ 0.5, MgCl·7H₂O 0.5, Agar 20.0, Trace salt solution 1.0 mL, pH 7.2;

(10) 30# (g/L): Sol starch 3.0, Yeast extract 0.15, Sucrose 0.15, CaCO₃ 0.3, Trace salt solution 1.0 mL, Agar 20.0;

Trace salt solution (g/L): FeSO₄·7H₂O 0.1, MnCl₂·4H₂O 0.1, ZnSO₄·7H₂O 0.1。

表1 东川干热河谷、元谋土林环境样品
Table 1 Samples from Dong Chuan DHRV and Yuan Mou SF

样品 Sample	样品类型 Type of sample	地理位置信息 Site information
DHRV-1	路边小小谷	N25°54'56.3" E103°16.744'
DHRV-2	小江路边岩石样	N26°10.001' E103°07.247'
DHRV-3	山谷紫色岩石	N26°12.672' E103°06.090'
DHRV-4	山谷某植物根系土样	N26°12.672' E103°06.090'
DHRV-5	山谷风化堆积岩石样	N26°12.672' E103°06.090'
DHRV-6	绿色岩石样	N26°14.957' E103°05.617'
DHRV-7	某植物根系土样	N26°14.957' E103°05.617'
DHRV-8	岩石剖面样品	N26°14.957' E103°05.617'
DHRV-9	泥石流堆积物	N26°00.645' E103°12.763'
SF-1	风化岩土	N25°51.112' E101°48.635'
SF-2	风化岩土	N25°51.114' E101°49.621'
SF-3	风化岩土	N25°51.112' E101°49.625'
SF-4	风化岩土	N25°51.128' E101°49.630'
SF-5	风化岩土	N25°51.164' E101°49.624'
SF-6	风化岩土	N25°51.202' E101°49.620'
SF-7	小坡柳植物根部岩土	N25°51.212' E101°49.620'
SF-8	风化岩土	N25°51.120' E101°49.582'
SF-9	沙土	N25°50.907' E101°49.437'
SF-10	黄岩土	N25°50.907' E101°49.437'
SF-11	风化坚硬岩土	N25°50.903' E101°49.511'
SF-12	剑麻下土壤	N25°50.903' E101°49.511'
SF-13	桉树下土壤	N25°50.946' E101°50.798'
SF-14	金沙江边	N25°57.727' E101°52.886'
SF-15	金沙江边	N25°57.697' E101°52.351'
SF-16	元谋土壤	N25°54.451' E101°52.661'
SF-17	元谋路边土林	N25°53.117' E101°52.879'
SF-18	元谋岩土	N25°52.423' E101°52.989'
SF-19	牛角瓜根部	N25°50.912' E101°49.393'

1.3 分离方法

1.3.1 样品预处理: 用无菌皮氏平板盛取样品, 进行 28 °C 自然风干(大约 3 d)。称取 2 g 风干样品于装有 18 mL 无菌水和无菌玻璃珠的锥形瓶中, 55 °C、200 r/min 振荡 30 min, 使蕴含在样品中的微生物充分释放, 同时杀灭不耐高温的细菌、霉菌等微生物。

1.3.2 分离方法与培养条件: 采用稀释涂布法分离。将上述处理好的样品稀释至 10^{-3} 后用无菌移液管取 0.2 mL 至分离平板上, 涂布, 45 °C 恒温培养箱中倒置培养 7 d。

1.3.3 挑菌及保藏: 经过形态特征简单地重复以后, ISP 2 培养基纯化, 牛奶管、甘油管和斜面 3 种形式保藏。

1.4 系统发育分析

1.4.1 基因组 DNA 提取及 16S rRNA 基因扩增: DNA 提取方法参照文献[13]。采用细菌通用引物进行 16S rRNA 基因扩增:

PA: 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3', 对应于 *E. coli* 的 7-24;

PB: 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 对应于 *E. coli* 的 1540-1522。

1.4.2 测序: 由上海生工生物工程有限公司及北京百泰克生物技术有限公司协助完成。

1.4.3 序列比对: 克隆测序获得 16S rRNA 基因全序列, 测一个反应选取 650 bp 左右序列, 利用 BLAST 搜索软件在 GenBank、EMBL、NCBI 等数据库中进行相似性搜索。序列比对网站有 EzTaxon server 2.1 (<http://147.47.212.35:8080/>)^[14] 和 NCBI-BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

1.4.4 系统发育树的构建与分析: 选取同源性较高的典型菌株作为参比对象, 用 ClustalX^[15] 软件进行序列比对, 并计算供试菌株与参比菌株之间的序列相似性。采用邻接法(Neighbor-Joining)^[16], MEGA 4^[17] 构建供试菌与参比菌之间的系统进化树。用于检验支持率的重复抽样次数为 1 000 次。

1.5 纤维素酶活性评价

纤维素酶活性评价参照沈雪亮和夏黎明的评价方法进行^[18]。将生长 96 h 的湿菌体接种到含有底物的 92#培养基中, 45 °C 倒置培养 96 h 后, 每板倒入 0.1% Congo red solution 至淹没培养基表面, 染色 1 h 后, 将染液倒掉, 加入 1 mol/L NaCl 溶液, 脱色 1 h。测量方法是从菌落边缘到透明圈边缘的距离(菌落边缘到透明圈边缘 0.1 cm 以内视为无活性, 大于等于 0.1 cm 视为有活性)。

92# (Trypticase soy yeast extract medium)培养基(g/L): Peptone 15.0, Soya tryptone 15.0, Yeast extract 3.0, Agar 15.0, Distilled water 1 000 mL, pH 7.0-7.2。

2 结果

2.1 干热环境高温放线菌多样性

对测序的 300 余菌株的 16S rRNA 基因序列的相似性分析得到以下结果: 高温放线菌分布于放线菌纲下 9 个亚目 15 个科 33 个属(见表 2)。其中链孢囊菌亚目(Suborder Streptosporangineae)和假诺卡氏菌亚目(Suborder Pseudonocardineae)多样性最为丰富, 分别分离到 9 个和 8 个属级类群的菌株。候选新属 2 个(YIM 75507、YIM 75000)、候选新种 3 个(YIM 75635、YIM 75677、YIM 75980)。共分离到链霉菌 155 株, 与链霉菌属的 36 个种有最近的系统发育关系, 是该环境最优势的放线菌类群; 其次为小单孢菌属有 63 株, 与该属的 19 个种有最近的系统发育关系, 是处于第二优势地位的放线菌类群; 第三是野野村氏菌属有 48 株, 与该属的 14 个种具有最近的系统发育关系。其余 133 株菌分布于放线菌门其它 30 个属内。从菌株的分布及数量来看, 云南干热环境可培养高温放线菌中链霉菌、小单孢菌和野野村氏菌是该环境的优势类群, 这与常温土壤环境基本一致^[3]。图 1 是分离到的 33 个属级类群代表菌株(包括候选新属)与其最相近的有效发表菌种的基于 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树。

由于以往的研究中高温放线菌的分离样品主要来源于堆肥环境, 所以本研究以堆肥环境作为对照, 将干热河谷和土林样品的纯培养高温放线菌多样性与堆肥环境进行比较(表 3)。

结果显示链霉菌属、小单孢菌属、野野村氏菌属、马杜拉放线菌属、假诺卡氏菌属、类诺卡氏菌属、韩国生工菌属、诺卡氏菌属、游动放线菌属、节杆菌属、拟无菌酸菌属、迪茨氏菌属、嗜地皮菌属、红球菌属、糖丝菌属及分枝杆菌属 16 个属是东川干热河谷与元谋土林环境样品中共有的类群, 优势类群均为链霉菌、小单孢菌和

表2 分离菌株的数量及多样性分布
Table 2 The numbers and distribution of diverse isolates

亚目 Suborder	科 Family	属名 Genus	种的个数 No. of specie	菌株数 No. of strains
假诺卡氏菌亚目	假诺卡氏菌科	拟无菌酸菌属 <i>Amycolatopsis</i>	2	6
Suborder Pseudonocardineae	Pseudonocardiaceae	糖单孢菌属 <i>Saccharomonospora</i>	1	1
		假诺卡氏菌属 <i>Pseudonocardia</i>	4	17
		植物内生放线菌属 <i>Actinophytocola</i>	1	1
	束丝放线菌科 Actinosynnemataceae	动孢放线菌属 <i>Actinokineospora</i>	1	1
		束丝放线菌属 <i>Alloactinosynnema</i>	1	1
		糖丝菌属 <i>Saccharothrix</i>	4	7
		涅什瓦列菌属 <i>Lechevalieria</i>	1	1
棒杆菌亚目	棒杆菌科 Corynebacteriaceae	棒杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	1	1
Suborder Corynebacterineae	分枝杆菌科 Mycobacteriaceae	分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	1	2
		诺卡氏菌科 Nocardiaceae	戈登氏菌属 <i>Gordonia</i>	1
	迪茨氏菌科 Dietziaceae	红球菌属 <i>Rhodococcus</i>	3	5
		诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i>	4	7
		迪茨氏菌属 <i>Dietzia</i>	3	3
小单孢菌亚目	小单孢菌科	疣孢菌属 <i>Verrucosispora</i>	1	1
Suborder Micromonosporineae	Micromonosporaceae	小单孢菌属 <i>Micromonospora</i>	19	63
		游动放线菌属 <i>Actinoplanes</i>	3	4
丙酸杆菌亚目	类诺卡氏菌科	类诺卡氏菌属 <i>Nocardioides</i>	4	13
Suborder Propionibacterineae	Nocardioidaceae	韩国生工菌属 <i>Kribbella</i>	3	9
动孢菌亚目	动孢菌科	动球菌属	1	3
Suborder Kineosporiineae	Kineosporiaceae	<i>Kineococcus</i>		
链孢囊菌亚目	拟诺卡氏菌科	高温双歧菌属 <i>Thermobifida</i>	1	3
Suborder Streptosporangineae	Nocardiopsaceae	拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>	1	2
		高温单孢菌科	珊瑚放线菌属 <i>Actinocorallia</i>	1
	Thermomonosporaceae	马杜拉放线菌属 <i>Actinomadura</i>	5	19
		螺孢菌属 <i>Spirillospora</i>	1	1
		高温单孢菌属 <i>Thermomonospora</i>	4	4
	链孢囊菌科	球孢囊菌属 <i>Sphaerisporangium</i>	1	1
	Streptosporangiaceae	野野村氏菌属 <i>Nonomuraea</i>	14	48
		高温多孢菌属 <i>Thermopolyspora</i>	1	4
		嗜地皮菌科	嗜地皮菌属	2
	弗兰克氏菌亚目	嗜地皮菌科	嗜地皮菌属	2
Suborder Frankineae	Geodermatophilaceae	<i>Geodermatophilus</i>		
微球菌亚目	微球菌科	节杆菌属	4	4
Suborder Micrococcineae	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>		
链霉菌亚目	链霉菌科	链霉菌属	36	155
Suborder Streptomycineae	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>		

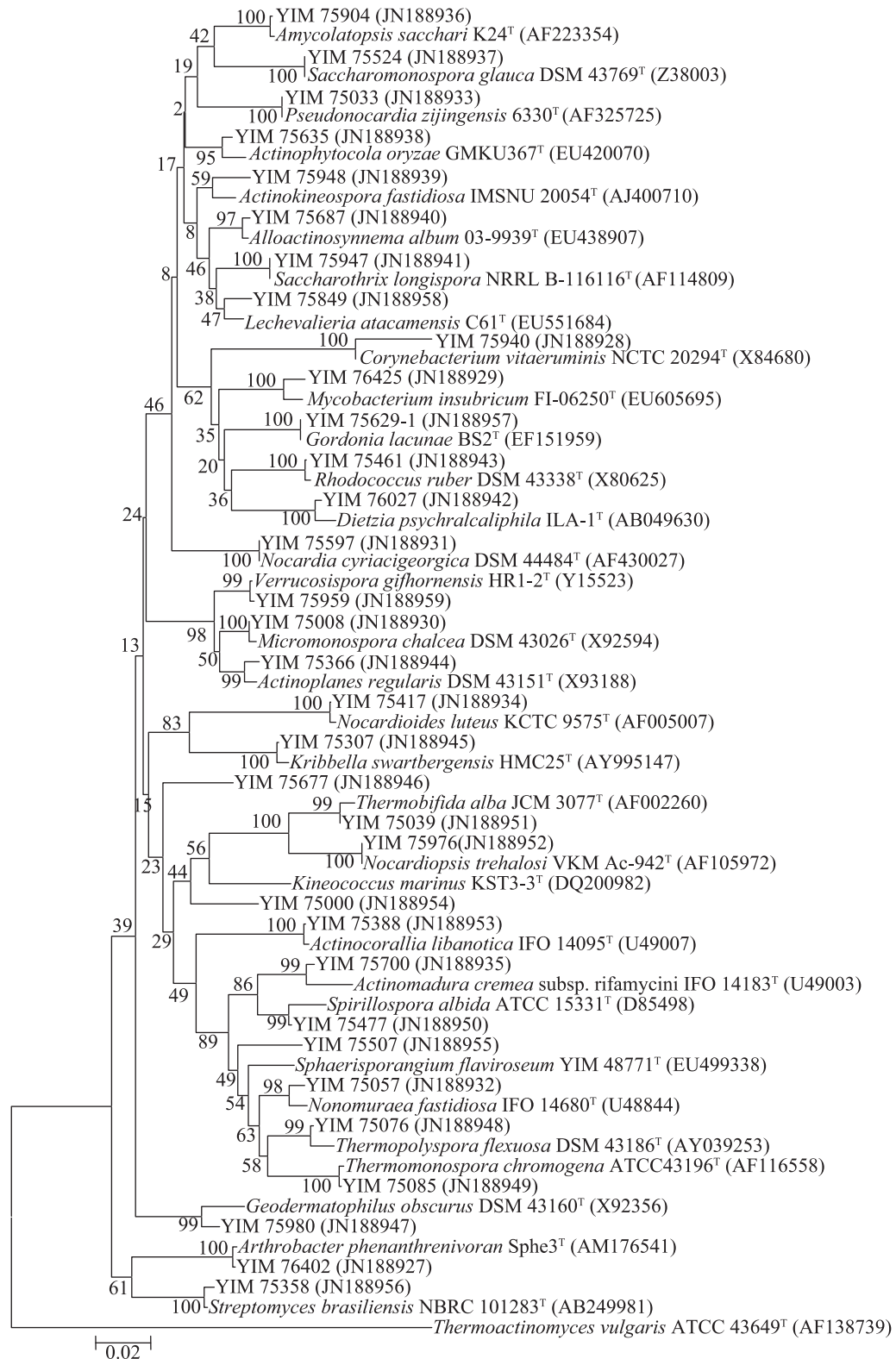


图 1 基于邻接法构建的云南干热环境放线菌 33 个属级类群 16S rRNA 基因系统发育树
 Fig. 1 Neighbour-Joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships of culturable strains in dry hot environments in Yunnan

注: 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 标尺或刻度 0.02 代表 2% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异.

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those type strains and the new isolates. The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications). The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position with their 16S rRNA gene sequences.

表 3 每个样点与菌种数量和类群的关系
Table 3 Diversity of thermophilic actinobacteria isolated from each sampling sites

类群 Group	干热河谷 Dry hot river valley	土林 Soil forest	堆肥 Compost	热泉 Hot spring	发现的菌种数目 Number of discovered strains
珊瑚放线菌属 <i>Actinocorallia</i>	1	0	0	0	1
动孢放线菌属 <i>Actinokineospora</i>	0	1	0	0	1
马杜拉放线菌属 <i>Actinomadura</i>	3	15	0	0	6
植物内生放线菌属 <i>Actinophytocola</i>	1	0	0	0	1
游动放线菌属 <i>Actinoplanes</i>	2	2	0	0	3
束丝放线菌属 <i>Alloactinosynnema</i>	1	0	0	0	1
拟无茵酸菌属 <i>Amycolatopsis</i>	2	4	0	0	2
节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	2	2	0	0	4
棒杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	1	0	0	0	1
迪茨氏菌属 <i>Dietzia</i>	1	2	0	0	3
嗜地皮菌属 <i>Geodermatophilus</i>	1	2	0	0	3
戈登氏菌属 <i>Gordonia</i>	1	0	0	0	1
动球菌属 <i>Kineococcus</i>	3	0	0	0	1
韩国生工菌属 <i>Kribbella</i>	6	3	0	0	3
涅什瓦列菌属 <i>Lechevalieria</i>	1	0	0	0	1
小单孢菌属 <i>Micromonospora</i>	30	28	0	1	17
分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	1	1	0	0	1
诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i>	5	2	0	0	4
类诺卡氏菌属 <i>Nocardioides</i>	7	5	0	0	4
拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>	0	2	0	0	1
野野村氏菌属 <i>Nonomuraea</i>	15	27	3	1	13
假诺卡氏菌属 <i>Pseudonocardia</i>	10	1	6	0	4
红球菌属 <i>Rhodococcus</i>	3	2	0	0	3
糖单孢菌属 <i>Saccharomonospora</i>	1	0	0	0	1
糖丝菌属 <i>Saccharothrix</i>	5	2	0	0	4
球孢囊菌属 <i>Sphaerisporangium</i>	1	0	0	0	1
螺孢菌属 <i>Spirillospora</i>	1	0	0	0	1
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	92	46	17	0	31
高温双歧菌属 <i>Thermobifida</i>	0	0	3	0	1
高温单孢菌属 <i>Thermomonospora</i>	0	0	4	0	4
高温多孢菌属 <i>Thermopolyspora</i>	0	0	4	0	2
疣孢菌属 <i>Verrucosispora</i>	0	1	0	0	1

野野村菌。除以上描述的类群外东川干热河谷环境样品中还分离到动球菌属、珊瑚放线菌属、植物内生放线菌属、束丝放线菌属、棒杆菌属、戈登氏菌属、涅什瓦列菌属、糖单孢菌属、球孢囊菌属、螺孢菌属等 10 个属的菌株。元谋土林环境样品中还分离得到拟诺卡氏菌属、动孢放线菌属、疣孢菌属等 3 个属的菌株。值得注意的是, 螺孢菌属菌株和疣孢菌属应该是在以往的研究中该环境未报道过的类群。在昆明市沙朗乡高温堆肥中共分离得到放线菌门下 6 个属, 分别为链霉菌属、假诺卡氏菌属、野野村氏菌属、高温多孢菌属、高温单孢菌属和高温双歧菌属。

通过比较发现在东川干热河谷以及元谋土林环境中发现的放线菌类群不仅在数量上远远超过堆肥环境, 在类群上也有很大的区别, 堆肥环境中发现了经典的高温放线菌类群, 如高温单孢菌、高温多孢菌、高温双歧菌等, 这几个类群在干热环境中完全没有被分离到。其余的稀有放线菌类群在堆肥环境中也未分离到。

2.2 纤维素酶活性评价

对分离得到的菌株进行纤维素酶活性筛选, 共得到 451 株菌的筛选结果。具有纤维素酶活性的菌株占筛选菌株的 57%。有活性的菌株中链霉菌为 110 株, 占进行纤维素酶活性筛选的链霉菌数量的 71%, 占具有纤维素酶活性全部测序菌株的 48%; 小单孢菌 39 株, 占进行纤维素酶活性筛选的小单孢菌数量的比例为 81%, 占具有纤维素酶活性全部测序菌株的 17%, 野野村氏菌 37 株, 占进行纤维素酶活性筛选的野野村氏菌株数量的 84% 占具有纤维素酶活性全部测序菌株的 16%。这三个类群是具有纤维素酶活性的菌株类群中的优势类群(表 4)。图 2 显示了具有纤维素酶活性的菌株类群和数量以及同类群中具有酶活的菌株占该类群的比例。

透明圈直径大于 1.0 cm 的放线菌菌株共有 30 株, 占筛选菌株的 1/15。其中链霉菌 14 株(包

括测序和未测序的菌株), 小单孢菌 7 株, 拟无枝酸菌 2 株, 类诺卡氏菌 1 株, 糖丝菌 1 株, 野野村氏菌 1 株, 拟诺卡氏菌 1 株, 分支杆菌 1 株, 动孢放线菌 1 株, 高温双歧菌 1 株, 见表 5。在高纤维素酶活性的菌株中链霉菌所占的比重最大, 约 47%, 其次为小单孢菌, 所占的比例约为 23%, 拟无枝酸菌所占的比例为 7%, 高温双歧菌属、拟诺卡氏菌属、分枝杆菌属、动孢放线菌属、糖丝菌属、野野村氏菌属、类诺卡氏菌属, 所占的比例分别为 4%、4%、3%、3%、3%、3%、3%, 所占的比例较小。

链霉菌和小单孢菌是分布最广泛且酶活比例及活性均较高的类群。说明链霉菌不仅是抗生素的主要产生菌, 而且在纤维素酶的产生上也可能具有较高的应用价值。小单孢菌的纤维素酶活性也较高, 如菌株 YIM 75382、YIM 75911、YIM 76079 的透明圈均为 1.2 cm, 可能具有纤维素酶开发与应用的潜力。国内 Qiu D. H. 等^[12]曾报道小单孢菌还具有棉花纤维的分解能力。

3 讨论

中国云南省境内有丰富的干热环境, 是研究高温放线菌的理想地点。本文针对云南省东川干热河谷、楚雄彝族自治州元谋土林、云南昆明沙朗乡堆肥及安宁温泉等环境进行高温放线菌的分离, 初步研究了该环境可培养高温放线菌的多样性, 并对分离得到的菌株进行纤维素酶活性筛选。结果发现干热河谷以及土林环境存在非常丰富的放线菌资源, 这些放线菌类群与土壤放线菌类群大体一致却又有着细微差别, 但是与高温堆肥环境中的放线菌无论在数量上还是类群上却相差很远, 且发现了一些稀有类群。分析可能的原因有以下两点: (1) 人们以往对高温堆肥环境研究较多, 对干热环境研究相对较少, 主要集中在沙漠等地热性土壤; (2) 环境因子, 如光照、湿度、温度等对放线菌的生长繁殖可

表 4 同一类群中具有纤维素酶活性的菌株及所占比例
Table 4 The proportion of each genus strains which can produce cellulase in all screened strains

类群 Group	该类群菌株数 Numbers of strains in the group	活性菌株数 Numbers of active strains	活性菌株所占的百分比 Ratio of the active strains in the group (%)	占具有酶活全部菌株数的百分比 Ratio in the total enzyme-producing strains in each group (%)
小单孢菌属 <i>Micromonospora</i>	48	39	81	17
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	155	110	71	48
野野村氏菌属 <i>Nonomuraea</i>	44	37	84	16
韩国生工菌属 <i>Kribbella</i>	9	7	78	3
糖丝菌属 <i>Saccharothrix</i>	7	6	86	3
游动放线菌属 <i>Actinoplanes</i>	4	4	100	2
拟无菌酸菌属 <i>Amycolatopsis</i>	6	3	50	1
高温双歧菌属 <i>Thermobifida</i>	3	3	100	1
马杜拉放线菌属 <i>Actinomadura</i>	17	2	12	0.9
类诺卡氏菌属 <i>Nocardioides</i>	11	2	18	0.9
拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>	2	2	100	0.9
高温单孢菌属 <i>Thermomonospora</i>	2	2	100	0.9
假诺卡氏菌属 <i>Pseudonocardia</i>	13	2	15	0.9
动孢放线菌属 <i>Actinokineospora</i>	1	1	100	0.4
植物内生放线菌属 <i>Actinophytocola</i>	1	1	100	0.4
节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	3	1	33	0.4
嗜地皮菌属 <i>Geodermatophilus</i>	2	1	50	0.4
戈登氏菌属 <i>Gordonia</i>	1	1	100	0.4
涅什瓦列菌属 <i>Lechevalieria</i>	1	1	100	0.4
分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i>	1	1	100	0.4
螺孢菌属 <i>Spirillospora</i>	1	1	100	0.4
疣孢菌属 <i>Verrucosispora</i>	1	1	100	0.4
珊瑚放线菌属 <i>Actinocorallia</i>	1	0	0	0
棒杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	1	0	0	0
动球菌属 <i>Kineococcus</i>	1	0	0	0
诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i>	7	0	0	0
红球菌属 <i>Rhodococcus</i>	5	0	0	0
糖单孢菌属 <i>Saccharomonospora</i>	1	0	0	0
高温多孢菌属 <i>Thermopolyspora</i>	2	0	0	0
束丝放线菌属 <i>Alloactinosynnema</i>	1	0	0	0
迪茨氏菌属 <i>Dietzia</i>	3	0	0	0
球孢囊菌属 <i>Sphaerisporangium</i>	1	0	0	0

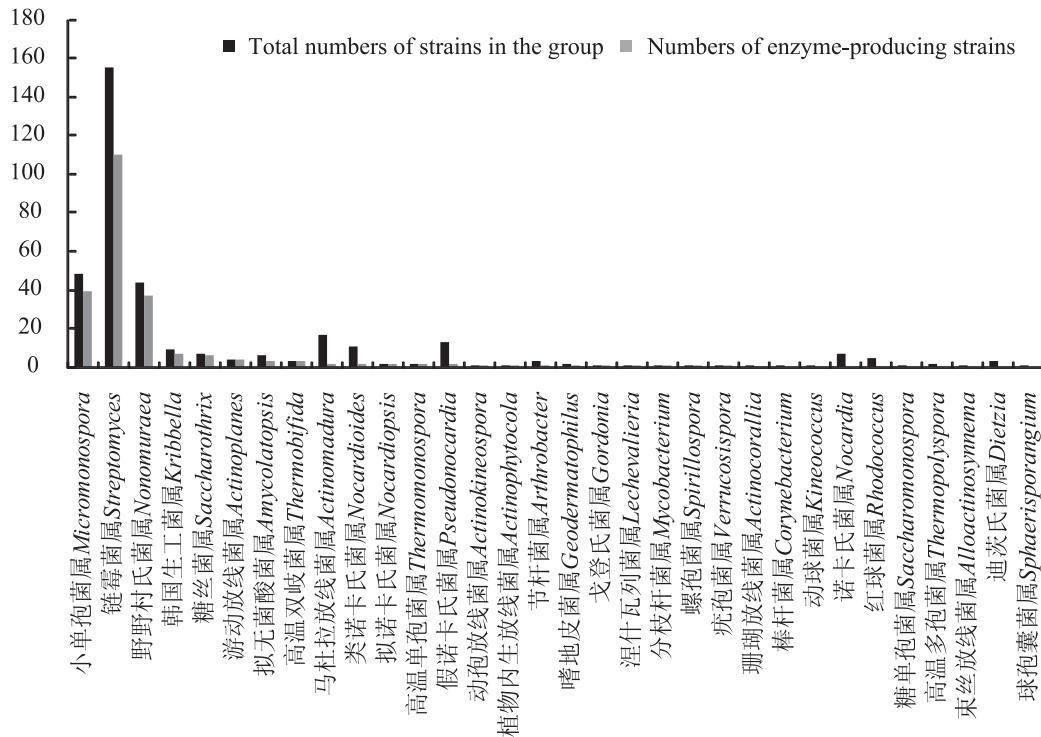


图 2 同一类群中具有纤维素酶活性的菌株与总筛选酶活菌株的数量对比图

Fig. 2 The contrast between the numbers of cellulase producing strains and all screened strains in each genus

表 5 高纤维素酶活性稀有放线菌

Table 5 Rare actinobacterial strains with high cellulase activity

菌株编号 Designated-strain number	最相近菌种 Most closely related species	分离地点 Sample sources	透明圈 Diameter of transparent circle (cm)
YIM 75039	<i>Thermobifida alba</i>	昆明沙朗乡堆肥	1.1
YIM 75948	<i>Actinokineospora fastidiosa</i>	元谋士林	1.2
YIM 75852	<i>Amycolatopsis fastidiosa</i>	东川干热河谷	1.2
YIM 75382	<i>Micromonospora echinofusca</i>	东川干热河谷	1.2
YIM 76079	<i>Micromonospora endolithica</i>	元谋士林	1.2
YIM 75911	<i>Micromonospora matsumotoense</i>	元谋士林	1.2
YIM 76032	<i>Micromonospora narathiwatensis</i>	元谋士林	1.1
YIM 76082	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i>	元谋士林	1.0
YIM 75860	<i>Micromonospora echinospora</i>	东川干热河谷	1.0
YIM 75905	<i>Micromonospora matsumotoense</i>	元谋士林	1.0
YIM 75628	<i>Nonomuraea coxensis</i>	东川干热河谷	1.0
YIM 75951	<i>Nonomuraea dietziae</i>	元谋士林	1.0
YIM 75947	<i>Saccharothrix longispora</i>	元谋士林	1.0
YIM 75938	<i>Amycolatopsis fastidiosa</i>	元谋士林	1.1
YIM 75417	<i>Nocardioidea luteus</i>	东川干热河谷	1.0
YIM 75976	<i>Nocardopsis trehalosi</i>	元谋士林	1.0

能有影响。本研究分离的菌株 57% 具有纤维素酶活性, 尤其是高酶活的菌株在干热环境下有着较为广泛的分布, 见表 5。希望本研究对今后认识和利用高温放线菌资源有一定的指导意义。

参考文献

- [1] 和致中, 彭谦, 陈俊英. 高温菌生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2001: i-ii.
- [2] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 24.
- [3] 徐丽华, 姜恺, 张华, 等. 微生物资源学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2010: 151-152.
- [4] Zhang ZS, Wang Y, Ruan JS. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(2): 411-422.
- [5] Yap WH, Zhang Z, Wang Y. Distinct types of rRNA operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for horizontal transfer of an entire rRNA operon[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(17): 5021-5209.
- [6] Kim SB, Yoon JH, Kim H, et al. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomonospora* conducted with 16S rRNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(2): 351-356.
- [7] Embley TM, Smida J, Stackebrandt E. Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Faenia rectivirgula*, *Pseudonocardia thermophila* and *Saccharopolyspora hirsuta*, three wall type IV actinomycetes which lack mycolic acids[J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134(4): 961-966.
- [8] Kim B, Sahin N, Minnikin DE, et al. Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalcalitolerans* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(1): 7-17.
- [9] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes[J]. Journal of Fermentation Technology, 1987, 65(5): 501-509.
- [10] Tang SK, Tian XP, Zhi XY, et al. *Haloactinospira alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete of the family *Nocardiopsaceae*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(9): 2075-2080.
- [11] Tang SK, Wang Y, Lee JC, et al. *Georgenia halophila* sp. nov., a halophilic actinobacterium isolated from a salt lake[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(6): 1317-1321.
- [12] Qiu DH, Ruan JS, Huang Y. Selective isolation and rapid identification of members of the genus *Micromonospora*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(17): 5593-5597.
- [13] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms[J]. Journal of Molecular Biology, 1961, 3(2): 208-218.
- [14] Chun J, Lee JH, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(10): 2259-2261.
- [15] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [18] 沈雪亮, 夏黎明. 产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究[J]. 林产化学与工业, 2002, 22(1): 47-51.