

研究报告

## 河北九莲城淖尔可培养放线菌多样性及抗菌活性筛选

李小俊<sup>1,2</sup> 吴越<sup>3</sup> 张伟铭<sup>3</sup> 李静<sup>2</sup> 刘少伟<sup>2</sup> 蒋忠科<sup>2</sup> 黄大林<sup>3</sup> 孙承航<sup>2\*</sup>

(1. 河北北方学院医学检验学院 河北 张家口 075000)

(2. 北京协和医学院&中国医学科学院医药生物技术研究所 北京 100050)

(3. 桂林医学院基础医学院 广西 桂林 541004)

**摘要:**【目的】勘探干涸的九莲城淖尔土壤放线菌多样性并进行活性筛选,以期发现药用微生物资源,为新抗生素的发现奠定基础。【方法】采用15种分离培养基,以稀释涂布法分离放线菌;根据分离菌株的16S rRNA基因序列同源性分析放线菌多样性;发酵液经乙酸乙酯萃取,菌丝体经丙酮浸提,获得提取浓缩物样品;样品通过纸片扩散法进行抗菌活性初筛;抗菌阳性菌株采用PCR技术进行I型聚酮合酶(PKS I)KS域、II型聚酮合酶(PKS II)KS域和非核糖体多肽合成酶(NRPS)A结构域抗生素生物合成基因的检测。【结果】从11份盐湖土壤样品中分离纯化到251株放线菌,其分布于放线菌纲的10个目15个科31个属,其中优势菌属为链霉菌属和拟诺卡氏菌属;251株放线菌中包括57株耐(嗜)盐放线菌,其优势菌属为拟诺卡氏菌属(22株)和涅斯捷连科氏菌属(15株)。基于16S rRNA基因序列的系统发育分析显示,菌株J11Y309为糖霉菌科潜在新属,菌株J12GA03为分枝杆菌科潜在新种。96株放线菌活性检测结果显示,56株至少对1株检定菌具有抗菌活性,阳性率为58.3%;56株有活性的放线菌中,47株至少含有1种抗生素生物合成基因,其中17株同时具有3种抗生素生物合成基因。【结论】干涸的九莲城淖尔土壤中含有较为丰富的药用放线菌资源,具有从中发现放线菌新物种和新抗生素的潜力。

**关键词:** 盐湖, 放线菌, 多样性, 抗菌活性, 耐药菌

**Foundation item:** Science and Technology Research Program for Colleges and Universities in Hebei Province (No. QN2014078); National Natural Science Foundation of China (No. 81373308); National Mega-Project for Innovative Drugs (No. 2012ZX09301-002-001-018)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-10-63165278; Fax: 86-10-63017302; E-mail: chenghangsun@hotmail.com

**Received:** November 13, 2015; **Accepted:** January 22, 2016; **Published online** (www.cnki.net): February 03, 2016

**基金项目:** 河北省高等学校科学技术研究项目(No. QN2014078); 国家自然科学基金项目(No. 81373308); 十二五“重大新药创制”科技重大专项(No. 2012ZX09301-002-001-018)

**\*通讯作者:** Tel: 86-10-63165278; Fax: 86-10-63017302; E-mail: chenghangsun@hotmail.com

**收稿日期:** 2015-11-13; **接受日期:** 2016-01-22; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-02-03

## Biodiversity and antimicrobial activity of culturable actinobacteria isolated from Jiuliancheng Nur in Hebei Province

LI Xiao-Jun<sup>1,2</sup> WU Yue<sup>3</sup> ZHANG Wei-Ming<sup>3</sup> LI Jing<sup>2</sup> LIU Shao-Wei<sup>2</sup>  
JIANG Zhong-Ke<sup>2</sup> HUANG Da-Lin<sup>3</sup> SUN Cheng-Hang<sup>2\*</sup>

(1. College of Laboratory Medical Science, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

(2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

(3. Faculty of Basic Medical Sciences, Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004, China)

**Abstract:** [Objective] To study the diversity and antimicrobial activity of culturable actinobacteria from dried Jiuliancheng Nur in Hebei Province, China. [Methods] Actinobacteria were isolated by using dilution plating technique with 15 media. Isolates were analyzed by comparison of 16S rRNA gene sequences. Crude extracts from fermented broth were obtained using ethyl acetate and from mycelia by acetone. Disk diffusion was used in antibacterial and antifungal assay and positive strains were further screened for PKS I, PKS II and NRPS antibiotics biosynthetic genes by PCR. [Results] A total of 251 actinobacterial strains, isolated from 11 soil samples, belonged to 31 genera affiliated with 15 families in 10 orders; and *Streptomyces* and *Nocardiopsis* are dominant genera. Out of these isolates, 57 were halotolerant or halophilic isolates, including 22 *Nocardiopsis* isolates and 15 *Nesterenkonia* isolates. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences showed that strain J11Y309 is a prospective novel genus affiliated with the family Glycomycetaceae and J12GA03 is a prospective novel member affiliated with the family Mycobacteriaceae. Out of 96 fermented strains, 56 exhibited positive activity in antibacterial or antifungal assay, and the total positive rate reached 58.3%. Out of 56 positive strains, 47 carried at least 1 antibiotic biosynthetic gene and 17 strains carried all the 3 genes. [Conclusion] Jiuliancheng Nur shows a rich biodiversity of culturable medicinal actinobacteria, and it is a valuable source of novel antibiotics.

**Keywords:** Salt Lake, Actinobacteria, Biodiversity, Antimicrobial activity, Drug-resistant bacteria

放线菌作为微生物药物的重要来源,广泛存在于土壤。近年来高海拔、深海、高盐碱、极寒、极旱等特殊生境中发现大量不同种类的放线菌,表明这一资源具有非凡的环境适应能力<sup>[1]</sup>,作为药用资源,其产物的特殊性、新颖性及生物活性受到越来越多的关注。

盐湖是一种高盐生境,广泛分布在干旱及半干旱地区,其中蕴藏着丰富的耐(嗜)盐微生物资源。自1975年发现第一株嗜盐放线菌 *Actinopolyspora halophila*<sup>[2]</sup>以来,据本实验室统计有效命名的耐(嗜)盐放线菌至少包括35个属,90多个种。国内外研究表明耐(嗜)盐放线菌是一类重要的抗生素产生菌。Wang等从耐盐的拟诺卡氏菌属菌株 *Nocardiopsis alkaliphila* YIM 80379 中分离到吡喃酮类化合物 Nocardipyrones A 和 B,其中 Nocardipyrones B 对

金黄色葡萄球菌和白假丝酵母菌具有较强抗菌活性<sup>[3]</sup>。Tian等从嗜盐的 *Nocardiopsis terrae* YIM 90022 中分离到的化合物 4-羧基-1,4-二氢喹啉-3-甲酰胺(喹啉类生物碱)和 2-乙酰氨基苯甲酸,对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌具有较好的抗菌活性<sup>[4]</sup>。

中国盐湖区位于北半球盐湖带的亚、非、欧大陆盐湖区的最东缘<sup>[5]</sup>,郑绵平把中国盐湖划分为4个区:青藏高原盐湖区(I)、西北盐湖区(II)、东北盐湖区(III)和东部分散盐湖区(IV)<sup>[6]</sup>,并进一步划分为13个亚区。目前针对我国盐湖可培养放线菌资源勘探主要集中在以新疆地区盐湖为代表的II区和以青海、西藏地区盐湖为代表的I区,从这些地区分离到了多株耐(嗜)盐放线菌,其中不乏一些放线菌新物种,如罗布泊来源的新种 *Saccharopolyspora halotolerans*<sup>[7]</sup> 和新属新种 *Allosalinactinospora*

*lopnoensis*<sup>[8]</sup>, 七角井盐湖来源的新属新种 *Haloactinopolyspora alba*<sup>[9]</sup>等, 但对盐湖数量较多的东北盐湖区(III)的相关报道较少, 对该区放线菌多样性及新颖性了解不多。

九莲城淖尔为河北内陆盐湖, 隶属于东北盐湖区鄂尔多斯盐湖亚区(III<sub>2</sub>), 处于河北与内蒙交接的张北高原, 湖面海拔 1 280 m, 含盐量高, 区域气候寒冷且干旱多风, 环境特殊<sup>[10]</sup>, 文献调研表明尚无放线菌资源及抗菌活性勘探相关研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品:** 2014 年 9 月采集九莲城淖尔土壤样品 11 份(编号: 3–13 号), 装于 50 mL 无菌离心管中, 运抵实验室后置 4 °C 保藏。3 号、11 号: 小区域水滩周围土样; 4 号、9 号: 盐碱层下土样; 5 号、12 号: 盐蒿子根际土样; 6 号: 盐碱表层; 7 号、10 号: 野生枸杞根际土样; 8 号: 未长植物非盐碱层下土样; 13 号: 芨芨草根际土样。另外采集农田土壤样 2 份, 编号: 1–2 号。

**1.1.2 主要试剂及仪器:** 2×Easy Taq SuperMix、High Fidelity PCR SuperMix、pEASY-T1 Cloning Kit、EasyPure Quick Gel Extraction Kit、Trans-T1 感受态细胞等, 北京全式金生物技术有限公司; Chelex-100 树脂, 美国 Bio-Rad 公司; Mueller-Hinton 培养基、酵母粉, 英国 OXOID 公司; 脑心浸液培养基、R2A 培养基, 美国 BD 公司; 萘啶酮酸、放线菌酮, 北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 高氏一号培养基, 北京奥博星生物技术有限公司。

高压蒸汽灭菌锅, 日本 SANYO 公司; 恒温培养箱和旋转式摇床, 上海智城分析仪器制造公司; 离心机, 德国 Sigma 公司; 凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; 旋转蒸发仪, 日本 EYELA 公司; PCR 扩增仪, 美国 Applied Biosystems 公司。

溶液 A (g/L): NaCl 7.5, KCl 0.1, CaCl<sub>2</sub> 0.1, NaHCO<sub>3</sub> 0.2, 焦磷酸钠 1.0, 酵母粉 60.0, 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min 备用。

**1.1.3 培养基:** (1) 分离培养基。M1: 腐殖酸培养基(HV)<sup>[11]</sup>。M2: 高氏一号培养基(GA); M3: 10% 营养琼脂(AG)<sup>[12]</sup>。M4: 改良的 ISP 2 培养基: 添加 1% (体积比)微量盐和 1% (体积比)复合维生素; 微量盐(g/L): FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1.0; 复合维生素(g/L): VB1 0.5, VB2 0.5, VB5 0.5, VB6 0.5, 烟酸 0.5, 肌醇 0.5, 生物素 0.5, 对氨基苯甲酸 0.5, 苯丙氨酸 1.0, 丙氨酸 0.3。M5: 改良纤维素酪素培养基(CCMS)<sup>[13]</sup>。M6: 淀粉酪素培养基(SC)<sup>[14]</sup>。M7: 棉籽糖组氨酸培养基(RH)<sup>[12]</sup>。M8: R2A 固体培养基。M9<sup>[15]</sup>。M10: CMKA 培养基<sup>[16]</sup>。M11: CMKA 培养基(5% NaCl)。M12: 淀粉酪素培养基(5% NaCl)。M13: 改良的甘油精氨酸培养基(g/L): 甘油 12.5, 精氨酸 2.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 2.0, NaCl 50.0, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.001, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.001。M14: GW1 琼脂培养基(5% NaCl)<sup>[17]</sup>。M15: 改良的甘油精氨酸培养基(10% NaCl)。每种培养基添加 5% (体积比)土壤浸出液, 调节 pH 至 7.2–7.5, 1×10<sup>5</sup> Pa 高压蒸汽灭菌 20 min, 待冷却至 55 °C 左右添加抑制剂: 萘啶酮酸 20 mg/L (终浓度)、放线菌酮 40 mg/L、重铬酸钾 50 mg/L。

(2) 纯化及保存培养基: ISP 2 固体培养基。

(3) 发酵培养基: 改良 ISP 2 培养基。

(4) 检定菌培养基: Mueller-Hinton (M-H)培养基用于培养金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌; 脑心浸液培养基用于培养白假丝酵母菌和罗伦隐球菌。

**1.1.4 检定菌:** 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC 27853、耐药株 2774、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922、耐药株 2800、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923、耐药株 2641、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) ATCC 29212、耐药株 ATCC 33186、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumonia*) ATCC 10031、耐药株 ATCC 700603、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)

ATCC 19606、耐药株 2799, 以上菌株为本所保藏; 白假丝酵母菌(*Candida albicans*) CCTCC 93025、罗伦隐球菌(*Cryptococcus laurentii*) CCTCC 91013 购于武汉大学中国典型培养物保藏中心。

## 1.2 方法

**1.2.1 样品处理与菌株的稀释平板分离:** 新鲜土样置无菌平皿中室温条件下自然风干, 然后用无菌研钵研磨成粉面状。称取 2 g 土样加入到 18 mL 溶液 A 中, 28 °C、180 r/min 摇床振荡 1 h; 吸取 1 mL 土壤悬液至 9 mL 无菌水中, 连续进行 10 倍梯度稀释, 使其终浓度为  $10^{-2}$  g/mL 和  $10^{-3}$  g/mL, 各取 0.2 mL 分别涂布于 15 种分离培养基平板上, 置恒温培养箱 28 °C 培养。

**1.2.2 菌株的纯化及保藏:** 培养 4-8 周后, 根据菌落特征初步排重, 挑取单菌落于 ISP 2 固体平板上进行分区划线纯化, 直至得到纯培养物。将纯化的菌株转接至 ISP 2 固体斜面, 待菌株生长好后, 置于 4 °C 保存。

**1.2.3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育学分析:** (1) 采用 Chelex-100 法<sup>[18]</sup>提取基因组 DNA。(2) 扩增引物为细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。50  $\mu$ L PCR 反应体系: 2 $\times$ Easy Taq SuperMix 25  $\mu$ L, 27F (20  $\mu$ mol/L) 1.5  $\mu$ L, 1492R (20  $\mu$ mol/L) 1.5  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L, 无菌水 20  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测; 将阳性结果的 PCR 产物交由英淮捷基(上海)贸易有限公司完成测序。对潜在新物种的 16S rRNA 基因通过 High Fidelity PCR SuperMix 扩增, 反应体系和条件同上; PCR 产物切胶回收, 连接到 pEASY-T1 克隆载体后, 转化至 *Trans1*-T1 感受态细胞中; 挑取阳性克隆子, 用引物 M13F (5'-GTTTTCCTCAGTCACGAC-3') 和 M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 进行 PCR 扩增, 验证克隆片段的大小, 交由英淮捷基(上海)贸易有限公司完成测序。(3) 将所得序列利用

BLAST 程序和 EzTaxon-e 工具<sup>[19]</sup>进行相似性比对。从中选取相似性较高的有效发表菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象, 然后用 BioEdit 进行多序列比对, 系统进化矩阵根据 Kimura-2 模型估算, 用 MEGA 5.0 软件<sup>[20]</sup>采用邻接法(Neighbour-Joining)进行聚类分析, 并构建出系统进化树<sup>[21]</sup>, 重复取样 1 000 次进行自展值(Bootstrap value)分析来评估系统进化树拓扑结构的稳定性。

**1.2.4 菌株发酵、次级代谢产物提取及抗菌活性筛选:** (1) 将长势良好的新鲜菌株接种于装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 每株接种 6 瓶, 180 r/min、28 °C 培养 7 d, 发酵液 4 500 r/min 离心 20 min, 上清液用等体积的乙酸乙酯萃取, 酯相减压浓缩至干后用 3 mL 甲醇溶解备用。菌体用一定量的丙酮浸泡过夜、过滤, 滤液减压浓缩至干后用 3 mL 甲醇溶解备用。(2) 将斜面生长良好的检定菌接种于装有 20 mL 液体培养基的 100 mL 三角瓶中, 180 r/min、37 °C 培养 12 h, 将菌悬液以 1% 的浓度(根据检定菌的长势可适当调整)加入至冷却到 55 °C 左右的灭菌 M-H 琼脂培养基中, 摇匀、倾注至培养皿内, 每皿 20 mL, 置 4 °C 备用。(3) 采用纸片扩散法进行抗菌活性检测。分别吸取甲醇溶解的乙酸乙酯萃取物或丙酮浸提物各 60  $\mu$ L 至直径为 6 mm 的圆形无菌滤纸片上, 待甲醇挥发干后, 贴于含有检定菌的检定板上, 同时以甲醇为阴性对照, 以双抗(1 000 Unit/mL 青霉素和 1 000 g/L 链霉素)作为阳性对照, 检定板于 37 °C 培养 16-24 h, 观察并记录抑菌圈的大小。

**1.2.5 抗菌阳性菌株抗生素生物合成基因的检测:** 对有抗菌活性的放线菌开展抗生素生物合成基因的检测, 包括 I 型聚酮合酶(PKS I) KS 域基因序列、II 型聚酮合酶(PKS II) KS 域基因序列及非核糖体多肽合成酶(NRPS) A 结构域基因序列的扩增。基因组 DNA 的提取方法和 PCR 反应体系同 1.2.3。扩增 3 种基因采用的引物和 PCR 反应条件分别为:

引物 K1F: 5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'; M6R: 5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'<sup>[22]</sup>, 扩

增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 0.5 min, 55 °C 2 min, 72 °C 4 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

引物 KS $\alpha$ : 5'-TSGCSTGCTTGAYGCSATC-3'; KS $\beta$ : 5'-TGGAANCCGCCGAABCCTCT-3'<sup>[22]</sup>, 扩增条件: 96 °C 2 min; 96 °C 1 min, 60 °C 2 min, 73 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 8.5 min。

A3F: 5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3'; A7R: 5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3'<sup>[23]</sup>, 扩增条件: 95 °C 5min; 95 °C 0.5 min, 59 °C 2 min, 72 °C 4 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 九莲城淖尔土壤可培养放线菌的多样性

从 11 份盐湖土样中分离纯化获得的纯培养物根据菌落形态初步排重, 选择 315 株菌进行 16S rRNA 基因扩增和序列比对, 结果表明其中 251 株为放线菌, 分布于放线菌纲的 10 个目 15 个科 31 个属, 分离得到各属的菌株见表 1。其中链霉菌目链霉菌属 101 株, 占所分离放线菌株的 40.2%, 是该盐湖生境最优势的放线菌类群; 链孢囊菌目拟诺卡氏菌属 48 株, 也是较为优势的类群。251 株放线菌中 57 株为耐(嗜)盐放线菌, 主要包括拟诺卡氏菌属 22 株(分离自 M11-M15 培养基)、涅斯捷连科氏菌属 15 株(分离自 M2、M8、M13 和 M15)、链霉菌属 6 株(分离自 M13)、其次为考克氏菌属 4 株(分离自 M13-M15)、栖白蚁菌属 3 株(分离自 M13 和 M14)、志恒刘氏菌属 3 株(分离自 M11)、节杆菌属 2 株(分离自 M11 和 M13)、红球菌属 1 株(分离自 M11)和潜在新物种 J11Y309 (分离自 M13)。部分代表菌株及其同源菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的 Neighbour-Joining 系统进化树见图 1。

不同样品和培养基中分离到的放线菌数量见图 2。分离效果显示(图 2A), 11 份盐湖土壤样品中, 3、5、6、10、11、12 和 13 号样品分离到的菌株较多, 这几份样品主要为植物根际土壤和水滩周围的土样, 而 4 号和 9 号为盐碱层下采集的土样, 分离得到的菌株最少。从分离培养基来分析(图 2B),

M2 (高氏一号培养基, GA)、M3 (10%营养琼脂, AG)、M4 (改良 ISP2)、M8 (R2A 培养基)、M13 和 M15 (改良甘油精氨酸培养基)分离得到的菌株较多。

此外, 还采集了 2 份九莲城盐湖周边的农田土样作比较, 从农田土样分离得到放线菌 50 株, 主要为链霉菌属(32 株)和节杆菌属(9 株), 还包括诺卡氏菌属、原小单孢菌属、拉氏杆菌属、威廉姆斯氏菌属(*Williamsia*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)和植物杆菌属(*Plantibacter*)。但是在盐湖土样中分离较多的拟诺卡氏菌属和涅斯捷连科氏菌属在这两份农田土样未分离得到。

另外分离得到一株放线菌, 编号为 J11Y309, 克隆获得该菌株的 16S rRNA 基因序列(1 494 bp), 将序列提交 GenBank, 登录号为 KR149811。序列比对发现该菌株与糖霉菌科 *Salininema proteolyticum* Miq-4<sup>T</sup>、*Paraglycomyces xinjiangensis* TRM 49201<sup>T</sup>、*Haloglycomyces albus* YIM 92370<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因序列相似度分别为 95.80%、95.77% 和 94.84%; 菌株 J11Y309 与同源菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的 Neighbour-Joining 系统进化树见图 3, 在进化树中菌株 J11Y309 与 *Salininema proteolyticum* Miq-4<sup>T</sup>、*Paraglycomyces xinjiangensis* TRM 49201<sup>T</sup> 和 *Haloglycomyces albus* YIM 92370<sup>T</sup> 聚成一簇, 并形成了一个独立的分支, 其遗传学地位在 Maximum-Likelihood 法和 Maximum-Parsimony 法构建的系统进化树中同样得到了验证, 以上结果提示该菌株为糖霉菌科潜在新属, 该菌株的多相分类研究将另文发表。

实验中还分离到菌株 J12GA03, 克隆获得该菌株的 16S rRNA 基因序列(1 483 bp), 将序列提交 GenBank, 登录号为 KU051698。序列比对发现该菌株与 *Amycolicococcus subflavus* DQS3-9A1<sup>T</sup> 和 *Hoyosella altamirensis* OFN S31<sup>T</sup> 的 16S rRNA 基因序列的相似度为 98.18%和 97.75%, 与分枝杆菌属有效发表种模式菌株的 16S rRNA 基因序列的相似度均低于 95.6%, 在 N-J 系统进化树中菌株 J12GA03

表 1 251 株放线菌的多样性分布  
Table 1 Genera distribution of 251 actinobacterial strains

目 Order	科 Family	属 Genus	菌株数量 No. of strains
链霉菌目 Streptomycetales	链霉菌科 Streptomycetaceae	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	101
链孢囊菌目 Streptosporangiales	拟诺卡氏菌科 Nocardiopsaceae	拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>	48
微球菌目 Micrococcales	微球菌科 Micrococcaceae	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	21
		涅斯捷连科氏菌属 <i>Nesterenkonia</i>	15
		考克氏菌属 <i>Kocuria</i>	6
		志恒刘氏菌属 <i>Zhihengliuella</i>	5
		微球菌属 <i>Micrococcus</i>	2
		柠檬酸球菌属 <i>Citricoccus</i>	1
		栖白蚁菌属 <i>Isoptericola</i>	7
	原小单孢菌科 Promicromonospora	原小单孢菌属 <i>Promicromonospora</i>	2
		微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	6
	微杆菌科 Microbacteriaceae	壤球菌属 <i>Agrococcus</i>	4
		<i>Compostimonas</i>	2
		拉氏杆菌属 <i>Rathayibacter</i>	1
		拉贝达氏菌属 <i>Labeledella</i>	1
		棍状杆菌属 <i>Clavibacter</i>	1
		壤霉菌属 <i>Agromyces</i>	1
		纤维单孢菌属 <i>Cellulomonas</i>	1
	诺卡氏菌科 Nocardiaceae	诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i>	4
		红球菌属 <i>Rhodococcus</i>	2
		迪茨氏菌属 <i>Dietzia</i>	2
		分枝杆菌科 Mycobacteriaceae	1
小单孢菌目 Micromonosporales	小单孢菌科 Micromonosporaceae	小单孢菌属 <i>Micromonospora</i>	4
		疣孢菌属 <i>Verrucosipora</i>	3
假诺卡氏菌目 Pseudonocardiales	假诺卡氏菌科 Pseudonocardiaceae	<i>Actinomycetospora</i>	2
		<i>Actinophytocola</i>	1
弗兰克氏菌目 Frankiales	地嗜皮菌科 Geodermatophilaceae	芽生球菌属 <i>Blastococcus</i>	1
动孢菌目 Kineosporiales	动孢菌科 Kineosporiaceae	动球菌属 <i>Kineococcus</i>	2
糖霉菌目 Glycomycetales	糖霉菌科 Glycomycetaceae	糖霉菌属 <i>Glycomyces</i>	2
		<i>Salininema</i>	1
丙酸杆菌目 Propionibacteriales	丙酸杆菌科 Propionibacteriaceae	<i>Auraticoccus</i>	1

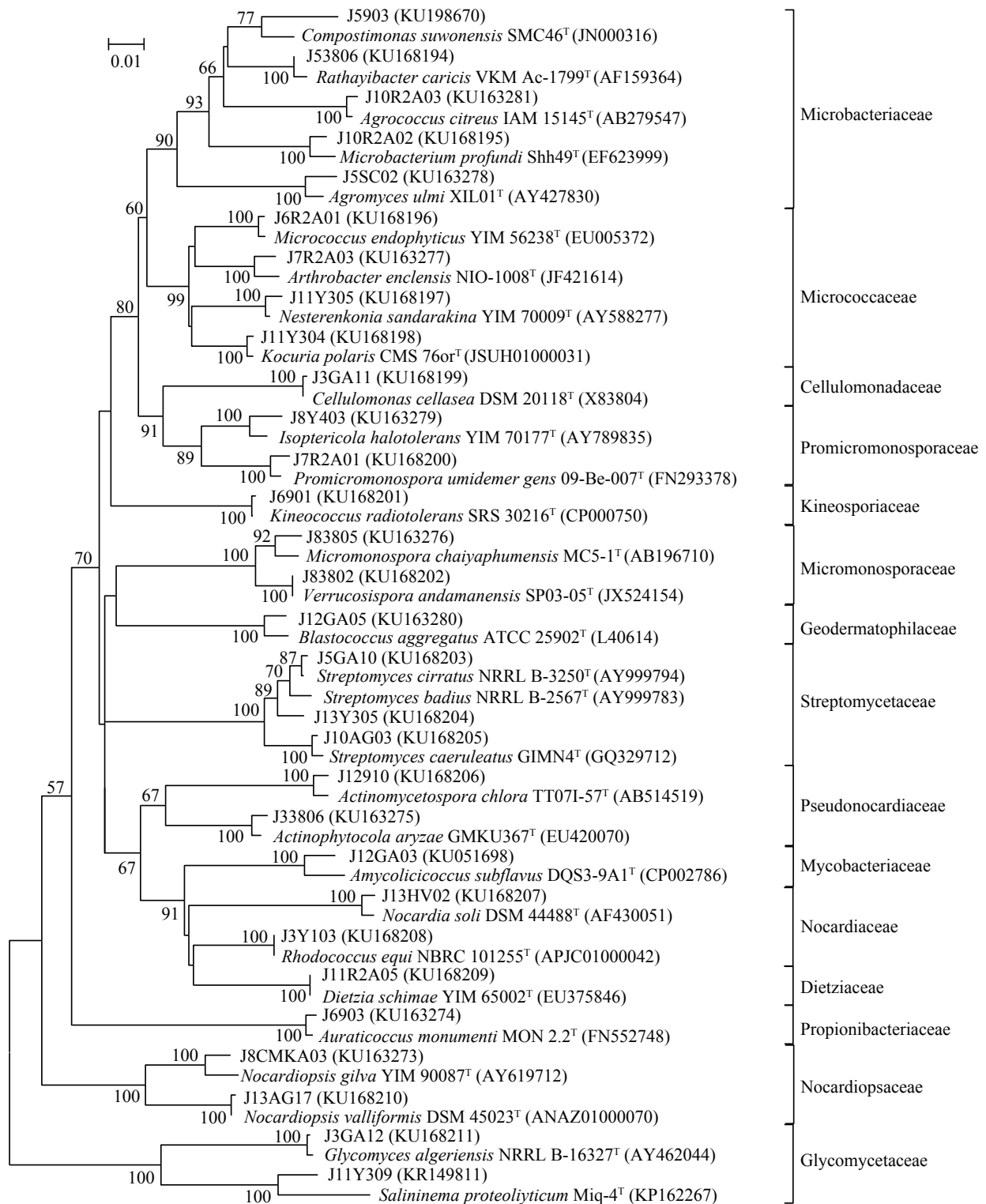


图 1 部分菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的 Neighbour-Joining 系统进化树

Figure 1 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of partial strains

注: 分支点上的数值为 1 000 次 Bootstrap 分析所得值, 仅显示大于 50% 的值; 标尺 0.01 为进化距离。

Note: Bootstrap values > 50% based on 1 000 replications are shown at branch nodes. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide positions.



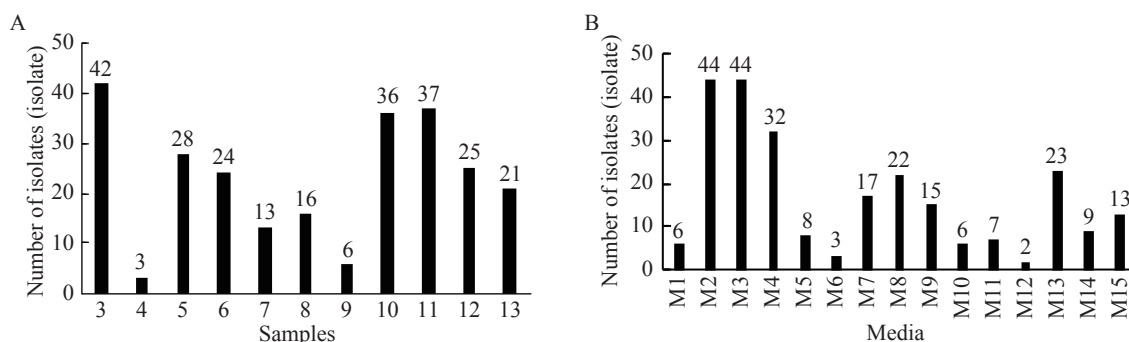


图2 不同样品(A)和培养基(B)中分离得到的放线菌数量  
Figure 2 Actinobacterial strains in different samples (A) and from different media (B)

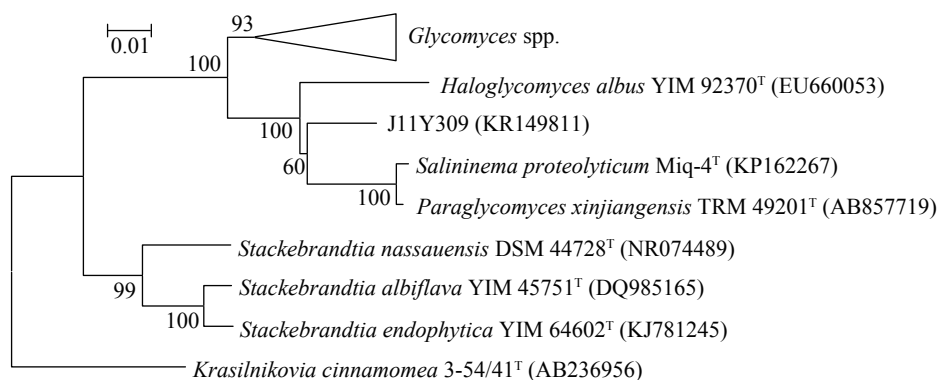


图3 基于16S rRNA基因序列构建的菌株J11Y309与糖霉属菌株的Neighbour-Joining系统进化树  
Figure 3 Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic relationships between strain J11Y309 and representatives of family Glycomycetaceae based on 16S rRNA gene sequences

注: 分支点上的数值为1000次Bootstrap分析所得值, 仅显示大于50%的值; 标尺0.01为进化距离。

Note: Bootstrap values > 50% based on 1000 replications are shown at branch nodes. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide positions.

在分枝杆菌科形成独立的进化支(图4), 提示该菌株为分枝杆菌科 *Hoyosella* 属潜在新种, 该菌株的多相分类研究将另文发表。

## 2.2 抗菌活性筛选结果

11份盐湖来源的土样中共分离到31个属的放线菌, 根据菌落特征和16S rRNA基因比对结果, 选取潜在新物种以及各属的代表菌株共96株放线菌进行摇瓶发酵, 菌株发酵液乙酸乙酯萃取浓缩物或菌丝的丙酮浸提浓缩物其中之一对检定菌显示有抗菌活性, 该菌株即为抗菌阳性菌株。活性检测结果显示56株(包括31株链霉菌和25株稀有放线菌)至少表现为对一株检定菌有抗菌活性, 30株具有抗革兰阳性细菌活性, 33株具有抗革兰阴性细菌

活性, 25株对白假丝酵母菌具有抗菌活性, 活性筛选结果见图5。统计结果还显示, 18株对鲍曼不动杆菌耐药株具有抗菌活性, 16株对大肠埃希菌耐药株具有抗菌活性, 12株对铜绿假单胞菌耐药株具有抗菌活性, 以及11株对产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)肺炎克雷伯菌具有抗菌活性。更有意义的是, 筛选到了8株具有广谱抗菌活性的菌株, 包括5株链霉菌和3株稀有放线菌(拟诺卡氏菌属、考克氏菌属和动球菌属各1株), 还筛选到2株对革兰阴性细菌有抗菌活性的稀有放线菌(涅斯捷连科氏菌属和志恒刘氏菌属各一株), 这10株菌的抗菌筛选结果见表2。

## 2.3 抗生素生物合成基因的筛选结果

对56株抗菌阳性菌株进行I型和II型聚酮合



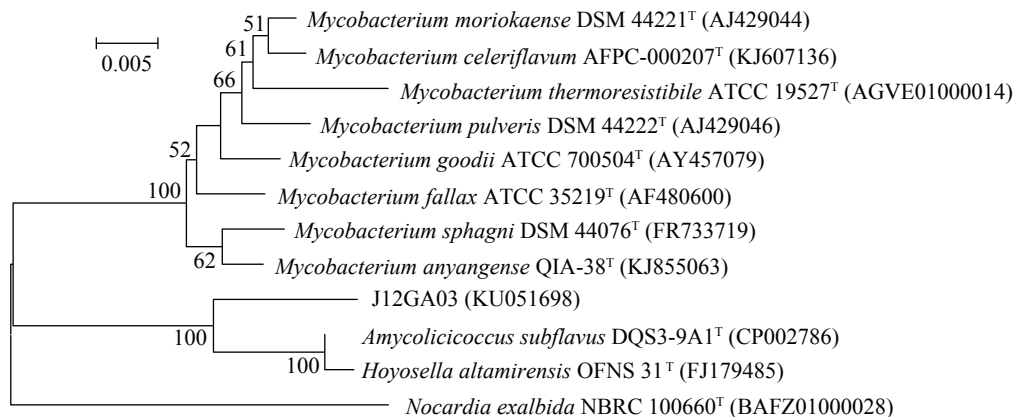


图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 J12GA03 与分枝杆菌科相关菌株的 Neighbour-Joining 系统进化树  
Figure 4 Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic relationships between strain J12GA03 and representatives of family Mycobacteriaceae based on 16S rRNA gene sequences

注: 分支点上的数值为 1 000 次 Bootstrap 分析所得值, 仅显示大于 50% 的值; 标尺 0.005 为进化距离。

Note: Bootstrap values >50% based on 1 000 replications are shown at branch nodes. Bar, 0.005 substitutions per nucleotide positions.

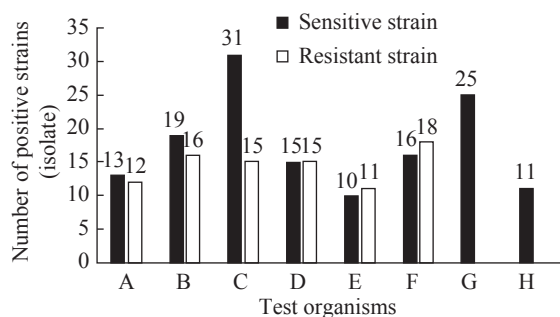


图 5 具有抗菌活性的阳性菌株数量

Figure 5 Positive strains with antibacterial and antifungal activities

注: A: 铜绿假单胞菌; B: 大肠埃希菌; C: 金黄色葡萄球菌; D: 粪肠球菌; E: 肺炎克雷伯菌; F: 鲍曼不动杆菌; G: 白假丝酵母菌; H: 罗伦隐球菌。

Note: A: *Pseudomonas aeruginosa*; B: *Escherichia coli*; C: *Staphylococcus aureus*; D: *Enterococcus faecalis*; E: *Klebsiella pneumoniae*; F: *Acinetobacter baumannii*; G: *Candida albicans*; H: *Cryptococcus laurentii*.

酶 KS 结构域及非核糖体多肽合成酶 A 结构域基因的 PCR 扩增。部分菌株扩增结果见图 6, 从图 6 中能明显观察到扩增片段长度分别在 1 200–1 400 bp 之间、600 bp 左右和 700–800 bp 之间的 PKS I、PKS II KS 域和 NRPS A 结构域基因的扩增条带。结果统计显示(图 7), 56 株活性菌株中 47 株至少具有 3 种抗生素生物合成基因中的一种, 其中

17 株同时具有 3 种生物合成基因, 而且链霉菌中具有该 3 种生物合成基因的菌株数量明显高于稀有放线菌。

### 3 讨论

据现有文献统计, 目前中国盐湖区 I 区和 II 区可培养耐(嗜)盐放线菌多数以拟诺卡菌属和链霉菌属居多<sup>[24-28]</sup>; 也有一些盐湖比较特殊, 以放线多孢菌属(*Actinopolyspora*)<sup>[17]</sup>或普劳氏菌属(*Prauserella*)<sup>[29]</sup>为优势菌属。除拟诺卡氏菌属、链霉菌属、普氏菌属和放线多孢菌属外, 从这些盐湖中分离到的耐(嗜)盐放线菌还包括链单孢菌属(*Streptomonospora*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、涅斯捷连科氏菌属(*Nesterenkonia*)、糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、糖霉菌属(*Glycomyces*)、姜氏菌属(*Jiangella*)、微球菌属(*Micrococcus*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、栖白蚁菌属(*Isopterocola*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)、纤维单孢菌属(*Cellulomonas*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)等。据中国盐湖生态学记载东北盐湖区(III区)有 309 个盐湖, 分布于鄂尔多斯高原、内蒙古高原和呼伦贝尔盆地, 盐湖数量依次

表 2 10 株活性菌株的抗菌效果  
Table 2 Antimicrobial activity of 10 actinobacterial strains

菌株 Strains	同源菌株 Closest type strain	相似率 Identity (%)	A(S)	A(R)	B(S)	B(R)	C(S)	C(R)	D(S)	D(R)	E(S)	E(R)	F(S)	F(R)	G(S)	H(S)
J13905	<i>Streptomyces turgidiscabies</i> ATCC 700248 <sup>T</sup>	99.64	++	+	++	+	+	-	-	-	+	+	+	++	-	+
J5GA10	<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC 13026 <sup>T</sup>	99.61	+++	+	++	++	+++	++	++	++	+++	+	++	++	-	+
J10GA08	<i>Streptomyces anulatus</i> NRRL B-2000 <sup>T</sup>	100	+++	++	+++	+++	+++	+	-	-	+	+	+	+	+++	-
J13GA03	<i>Streptomyces</i> <i>polyantibioticus</i> SPR <sup>T</sup>	99.57	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	-	++	+	+	++
J11GA01	<i>Streptomyces setonii</i> NBRC 13085 <sup>T</sup>	100	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	+	-	+++	-
J10AG11	<i>Nocardioopsis valliformis</i> DSM 45023 <sup>T</sup>	99.71	-	-	++	+	+++	-	-	-	+	-	+	-	-	-
J13Y104	<i>Zhihengliuella halotolerans</i> YIM 70185 <sup>T</sup>	99.71	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-
J12R2A07	<i>Nesterenkonia sandarakina</i> YIM 70009 <sup>T</sup>	100	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
J6Y306	<i>Kocuria rosea</i> DSM 20447 <sup>T</sup>	99.32	+	++	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
J6901	<i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216 <sup>T</sup>	100	-	-	++	++	++	+	-	+	++	+	++	+	+	-

注：A：铜绿假单胞菌；B：大肠埃希菌；C：金黄色葡萄球菌；D：粪肠球菌；E：肺炎克雷伯菌；F：鲍曼不动杆菌；G：白假丝酵母菌；H：罗伦隐球菌。S：敏感菌株；R：耐药菌株。-：无活性；+：6-8 mm；++：8-10 mm；+++：>10 mm。

Note: A: *Pseudomonas aeruginosa*; B: *Escherichia coli*; C: *Staphylococcus aureus*; D: *Enterococcus faecalis*; E: *Klebsiella pneumoniae*; F: *Acinetobacter baumannii*; G: *Candida albicans*; H: *Cryptococcus laurentii*. S: Sensitive strain; R: Drug-resistant strain. -: Negative; +: 6-8 mm; ++: 8-10 mm; +++: >10 mm.

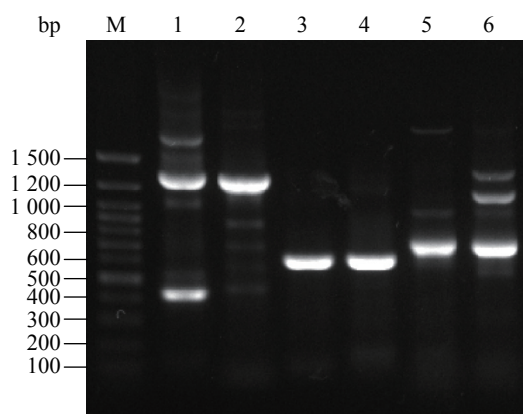


图 6 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因电泳检测结果

Figure 6 Results of agarose gel electrophoresis for PKS I, PKS II and NRPS genes

Note: M: 100 bp Plus DNA ladder; 1, 2: PKS I; 3, 4: PKS II; 5, 6: NRPS.

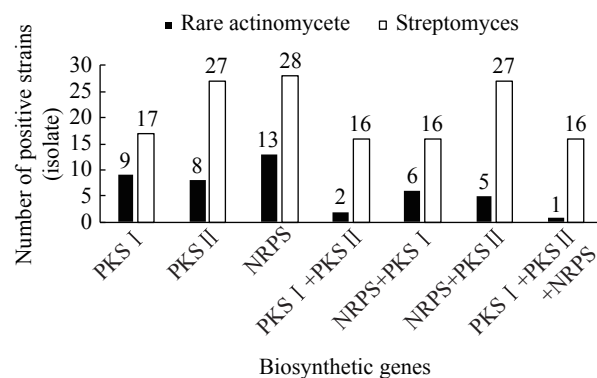


图 7 PKS I、PKS II 和 NRPS 基因筛选结果

Figure 7 Results of screening on PKS I, PKS II and NRPS genes

于青藏高原盐湖区,但是关于该区可培养放线菌资源的勘探较少。九莲城淖尔和察汗淖为河北仅有的两个盐湖,属于III区的鄂尔多斯盐湖亚区,河北地区虽有关于沧州环渤海盐池、盐碱等高盐环境放线菌的报道,但是这两个盐湖却未见相关报道。而且近年来九莲城淖尔和察汗淖受周边人类活动的影响,原始的生态环境受到了一定的破坏,因此本研究的开展对其中特殊的放线菌资源也具有一定的保护意义。

本研究从干涸的九莲城淖尔 11 份土样中分离到包括 31 个属在内的 251 株放线菌,说明该生境放线菌物种丰富;其中耐(嗜)盐放线菌 57 株,主要是拟诺卡氏菌属、涅斯捷连科氏菌属和链霉菌属,这种组成特点和 I 区和 II 区盐湖可培养放线菌的种类相似,与以上盐湖不同的是在本盐湖中分离到了较多的涅斯捷连科氏菌属菌株,并且分离到了耐(嗜)盐的志恒刘氏菌属和节杆菌属,但是盐湖中常见的放线多孢菌属、链单孢菌属、糖单孢菌属、糖多孢菌属在本研究中未分离到。对比盐湖周边农田土样中分离得到的放线菌,很容易发现该盐湖土样中分离较多的拟诺卡氏菌属和涅斯捷连科氏菌属在农田土样未分离得到;此外,从该生境分离到了潜在新物种 J11Y309 和 J12GA03,文献调研发现其同源菌株 *Salininema proteolyticum* Miq-4<sup>T</sup> (2015, 伊朗)、*Paraglycomyces xinjiangensis* TRM 49201<sup>T</sup> (2015, 中国)、*Haloglycomyces albus* YIM 92370<sup>T</sup> (2015, 中国) 和 *Amycolicococcus subflavus* DQS3-9A1<sup>T</sup> (2010, 中国)均分离自高盐环境,以上均说明盐湖具有其特殊的微生物群落构成。

本研究活性检测筛选到了 56 株抗菌阳性菌株,尤其是筛选到了多株对耐药革兰阴性菌具有抗性的菌株。5 株具有较优抗菌活性的稀有放线菌中,菌株 J10AG11 (*Nocardiosis* sp.)和菌株 J6901 (*Kineococcus* sp.)各携带 PKS I、PKS II 和 NRPS 中的两种抗生素生物合成基因;文献调研发现拟诺卡氏菌属放线菌是重要的抗生素产生菌,因此菌株

J10AG11 值得进一步开展活性次级代谢产物的分离、纯化和鉴定等工作;动球菌属放线菌虽没有活性次级代谢产物的相关报道,但鉴于近年来研究学者对稀有放线菌来源的新抗生素的极大关注,这株稀有放线菌(菌株 J6901)也值得开展下一步的研究工作,以期发现结构独特、生物活性广泛的先导化合物。

## 参考文献

- [1] Zenova GM, Manucharova NA, Zvyagintsev DG. Extremophilic and extremotolerant actinomycetes in different soil types[J]. Eurasian Soil Science, 2011, 44 (4): 417-436
- [2] Gochbauer MB, Leppard GG, Komaratat P, et al. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1975, 21(10): 1500-1511
- [3] Wang ZY, Fu P, Liu PP, et al. New pyran-2-ones from alkalophilic actinomycete, *Nocardiosis alkaliphila* sp. nov. YIM-80379[J]. Chemistry & Biodiversity, 2013, 10(2): 281-287
- [4] Tian SZ, Yang YB, Liu K, et al. Antimicrobial metabolites from a novel halophilic actinomycete *Nocardiosis terrae* YIM 90022[J]. Natural Product Research, 2014, 28(5): 344-346
- [5] Zhao W, Yin XW, Zhang P, et al. Ecology of inland saline lakes in China[M]. Beijing: Science Press, 2010 (in Chinese)  
赵文, 殷旭旺, 张鹏, 等. 中国盐湖生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2010
- [6] Zheng MP. On saline lakes of China[J]. Mineral Deposits, 2001, 20(2): 181-189 (in Chinese)  
郑绵平. 论中国盐湖[J]. 矿床地质, 2001, 20(2): 181-189
- [7] Lv LL, Zhang YF, Xia ZF, et al. *Saccharopolyspora halotolerans* sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a hypersaline lake[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(10): 3532-3537
- [8] Guo L, Tuo L, Habden X, et al. *Allosalinactinospora lopnorenensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiosaceae isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(1): 206-213
- [9] Tang SK, Zhi XY, Wang Y, et al. *Haloactinopolyspora alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete isolated from a salt lake, with proposal of *Jiangellaceae* fam. nov. and *Jiangellineae* subord. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(1): 194-200
- [10] Zheng XY, Zhang MG, Xu C, et al. Chinese Saline Lakes[M]. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese)  
郑喜玉, 张明刚, 徐昶, 等. 中国盐湖志[M]. 北京: 科学出版社, 2002
- [11] Hayakawa M. Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil[J]. Actinomycetologica, 2008, 22(1): 12-19
- [12] Dong YP, Guo L, Xugela HBD, et al. Study on diversity and bioactivity of actinomycetes isolated from the south edge of the Taklamakan Desert[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(4): 241-247 (in Chinese)  
董艳萍, 郭琳, 旭格拉·哈布丁, 等. 塔克拉玛干沙漠南麓土壤放线菌资源勘探及抗菌活性筛选[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(4): 241-247
- [13] Tang SK, Tian XP, Zhi XY, et al. *Haloactinospora alba* gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete of the family Nocardiosaceae[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(9): 2075-2080

- [14] Li WJ, Tang SK, Wang D, et al. A primary study on biodiversity of moderately halophilic actinomycetes in Xinjiang and Qinghai area[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(1): 1-7 (in Chinese)  
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[J]. *微生物学报*, 2004, 44(1): 1-7
- [15] Yuan LJ, Zhang YQ, Yu LY, et al. *Actinopolymorpha cephalotaxi* sp. nov., a novel actinomycete isolated from rhizosphere soil of the plant *Cephalotaxus fortunei*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(1): 51-54
- [16] Guan TW, Zhao K, Xia ZF, et al. Comparison of isolation media for actinobacteria from different saline environments in Xinjiang, China[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, 16(3): 429-431 (in Chinese)  
关统伟, 赵珂, 夏占峰, 等. 新疆高盐环境土壤放线菌分离培养基比较[J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(3): 429-431
- [17] Guan TW, Wu JY, Tang SK, et al. Phylogenetic diversity of halophilic actinomycetes from hypersaline environments in Tarim Basin of Xinjiang, China[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(11): 1698-1702 (in Chinese)  
关统伟, 吴晋元, 唐蜀昆, 等. 新疆塔里木盆地可培养嗜盐放线菌系统发育多样性[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(11): 1698-1702
- [18] Zhou SQ, Huang XL, Huang DY, et al. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010(2): 123-125 (in Chinese)  
周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. *生物技术通报*, 2010(2): 123-125
- [19] Kim OS, Cho YJ, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(3): 716-721
- [20] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739
- [21] 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
- [22] Metsä-Ketelä M, Salo V, Halo L, et al. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 180(1): 1-6
- [23] Gontang EA, Gaudêncio SP, Fenical W, et al. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2487-2499
- [24] Chen YG, Jiang Y, Li WJ, et al. Microbial diversity and screening of antitumor activity of actinomycete strains from saline and alkaline environments in the Qinghai Province, P. R. China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(5): 757-762 (in Chinese)  
陈义光, 姜怡, 李文均, 等. 青海盐碱环境中具抗肿瘤活性放线菌的筛选和多样性研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(5): 757-762
- [25] Zhang GJ, He JQ. Populations of moderately-halophilic actinomycetes in the Nam Co salt lake[J]. *Arid Zone Research*, 2013, 30(5): 856-859 (in Chinese)  
张格杰, 何建清. 纳木错盐湖中度嗜盐放线菌区系研究[J]. *干旱区研究*, 2013, 30(5): 856-859
- [26] Guan TW, Teng Y, Ren D, et al. Diversity and PKS II genes on the cultured actinobacterial in Lop Nur[J]. *Biotechnology*, 2014, 24(5): 68-71 (in Chinese)  
关统伟, 滕芸, 任丹, 等. 罗布泊盐湖可培养放线菌多样性及 PKS II 功能基因筛选[J]. *生物技术*, 2014, 24(5): 68-71
- [27] Xia ZF, Guan TW, Ruan JS, et al. Studies on the actinobacterial diversity in Aiding Lake sediments[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(8): 1023-1031 (in Chinese)  
夏占峰, 关统伟, 阮继生, 等. 艾丁湖沉积物放线菌多样性[J]. *微生物学报*, 2011, 51(8): 1023-1031
- [28] Cao LL, Wang Y, Tang SK, et al. Biodiversity and enzyme screening of actinomycetes from Hami Lake[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(3): 287-293 (in Chinese)  
曹兰兰, 王芸, 唐蜀昆, 等. 新疆哈密地区盐湖放线菌的多样性及其功能酶的筛选[J]. *微生物学报*, 2009, 49(3): 287-293
- [29] Jiang Y, Li WJ, Xu P, et al. Study on diversity of actinomycetes under salt and alkaline environments[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(2): 191-195 (in Chinese)  
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