

青岛泊子盐场放线菌多样性及其功能酶的筛选

常显波¹, 刘文正², 张晓华²

(1. 烟台大学 环境与材料工程学院, 山东 烟台 264005;

2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 采用平板涂布法利用 3 种培养基从青岛即墨市田横镇泊子盐场盐池底泥样中共分离纯化出 15 株放线菌, 对分离菌株进行 16S rRNA 基因测序分析。发现这 15 株放线菌分属于链霉菌属 (*Streptomyces*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) 和 1 个新属, 其中 *Streptomyces* 属为优势菌属; 菌株 CXB832 与 *Nocardiopsis arabia* DSM 45083^T 和 *Haloactinospira albus* DSM 45015^T 最接近, 同源性分别为 95.4% 和 94.9%, 根据其表型和分子特征可以初步判定该菌株为放线菌新属。培养基及培养温度对盐池环境中放线菌的分离效果均有影响, 利用淀粉酪素培养基在 37℃ 分离的放线菌种类和数量较多。在 15 株放线菌中, 分别有 12 株、3 株、2 株和 1 株放线菌产淀粉酶、酯酶、蛋白酶和纤维素酶。

关键词: 盐池; 放线菌; 多样性; 极端酶

中图分类号: Q938; Q936 文献标志码: A

Biodiversity of actinomycetes from Pozi saltern in Qingdao and the screening for functional enzymes

CHANG Xian-bo¹, LIU Wen-zheng², ZHANG Xiao-Hua²

(1. College of Environmental & Material Engineering, Yantai University, Yantai, Shandong 264005, China;

2. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003, China)

Abstract: In this study, 15 actinomycetes were isolated using three different media (M1 ~ M3) from a salt pond of Qingdao. Bioinformatics analysis of the 16S rRNA sequences from the isolates revealed they belonged to three genera (*Streptomyces*, *Nocardiopsis* and a novel genus), with *Streptomyces* being the dominant genus. The strain CXB832 were 95.4 % and 94.9 % homologous to the two standard strains of bacteria, and therefore was candidates for a new genus on the basis of phenotypic, chemotaxonomic and phylogenetic distinctiveness. The type of medium and temperature showed significant effects on the number and diversity of actinomycetes recovered. Starch casein medium was the most effective media to isolate actinomycetes species at 37°C. 12, 3, 2 and 1 of 15 isolates produces amylase, lipase, caseinase and cellulose, respectively.

Keywords: salt pond; actinomycetes; diversity; hydrolase

极端微生物 (Extreme microorganism) 是指那些在一般生物不能生存的条件下 (如高酸、高碱、高温、低温、高压、高盐、高辐射等) 能生存的生物^[1], 由于其特殊的生存机制, 可能会产生一些具有特殊活性的代谢产物, 对人类的生产和生活具有重大的应用价值。目前, 人们只是知道极端环境中存在微生物的存在, 但对具体的种类和数量却了解的很少。对于极端环境之一的高盐环境微生物的研究, 长期以来主要集中在嗜盐古菌和嗜盐细菌方面, 关于嗜盐放线

菌的报道还不多见^[2]。而放线菌因为能产生多样的次级代谢产物, 在任何生态环境中都是一类重要的微生物资源, 特别是在高盐环境下的嗜盐放线菌, 作为抗生素和酶制剂^[3]资源日益受到各国微生物学家的普遍关注和广泛研究, 嗜盐放线菌是一类新型的、极具应用前景的微生物资源。即墨市田横镇泊子盐场是青岛地区的 8 个集体盐场之一, 位于即墨沿海。本文研究了泊子盐场盐池底泥样品中放线菌的多样性以及产酶特性, 为其开发利用奠定基础。

1 材料与方法

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。刚果红、羧甲基纤维素钠购自上海生物工程有限公司。高压灭菌锅为上海产 LS-B50L、高速冷冻离心机为 Eppendorf 公司 5817R 型、PCR 仪为 Eppendorf AG 22331 Hamburg; 凝胶成像系统 GK-330C 购自美国伯乐公司。

1.1.2 培养基 (1) 分离培养基: 改良 ISP5 培养基 M1(酵母膏 5.0 g, L-天冬氨酸 1.0 g, 甘油 10.0 g, K_2HPO_4 1.0 g, KNO_3 5.0 g, 微量盐 1.0 mL, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 200.0 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.5)、淀粉酪素培养基 M2(淀粉 10.0 g, 酪素 0.3 g, KNO_3 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, K_2HPO_4 2.0 g, $CaCO_3$ 0.02 g, $FeSO_4$ 10.0 mg, NaCl 150.0 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.5)、改良淀粉酪素培养基 M3(葡萄糖 10.0 g, 酪素 0.3 g, KNO_3 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 g, K_2HPO_4 2.0 g, $CaCl_2$ 1.0 g, $FeSO_4$ 10 mg, 复合盐(NaCl:KCl: $MgCl_2$ = 4:4:1)150.0 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.5), 每种培养基均加入 $K_2Cr_7O_4$ ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 用于抑制真菌和细菌。(2) 酶活筛选的基础培养基为淀粉琼脂培养基(10% NaCl)。筛选放线菌酯酶、纤维素酶、蛋白酶活性的培养基为基础培养基分别加入吐温 80(1%)、羧甲基纤维素钠(1%)、干酪素(1%)。

1.2 样品采集和菌株分离

样品采自即墨市田横镇泊子盐场, 包括盐池泥样 2 份、卤水池泥样 6 份、壕沟泥样 1 份、盐池外泥样 1 份和潮间带泥样 1 份, 共计 11 份样品, 用无菌三角烧瓶盛放, 放于冰盒保存。采用传统的平板涂布法对样品进行分离, 在 28℃ 和 37℃ 分别培养 7~30 d。根据菌落大小、形态、颜色进行初步分离筛选并纯化, 将纯化后的菌株接种到添加 10% NaCl 的 ISP 2^[4] 斜面上, 培养 5~7 d 后, 以 4.5 ml 灭菌保种液(0.85% NaCl 溶液 + 15% 甘油)洗下菌苔, 制成菌悬液, 每个菌种保存 3 管, 保存于 -80℃ 的超低温冷冻箱中。

1.3 产酶菌株的筛选

参照文献[5]、[6]的方法进行。

1.4 表型特征测定

1.4.1 培养特征测定 利用 ISP2^[4] 液体培养基测定分离菌株的最适生长 NaCl 的质量分数、最适生长 pH 值和最适生长温度。

1.4.2 化学特征测定 采用快速薄层层析法进行全细胞氨基酸及全细胞水解液糖型的分析^[7]。参照

Lechevalier 等的方法进行磷酸类脂的提取、纯化^[8], 并用改良的薄层层析法^[9]进行磷酸类脂组分分析。参照 Collins 的方法进行醌的提取和分析^[10]。

1.5 分子与系统发育特征分析

1.5.1 DNA 中(G+C)的摩尔分数测定 小量提取 DNA 后, 采用 HPLC 法进行(G+C)摩尔分数的测定^[11]。

1.5.2 16S rRNA 基因 PCR 扩增和系统进化分析 参照文献[12]方法提取放线菌基因组 DNA, 应用细菌 16S rRNA 基因通用引物(正向引物: 8-27F, 反向引物: 1429-1445R)进行 PCR 扩增。测序所得结果用 Blast 软件在 GenBank/EMBL/DDBJ 等数据库中进行相似性搜索, 选取同源性比较高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象, 用 Clustal-X^[13] 软件进行多重序列比对, 利用 MEGA-4^[14] 软件, 采用邻接法(Neighbor-Joining Method)进行聚类分析和系统进化树构建。

2 结果与分析

2.1 培养基对盐环境放线菌分离的影响

盐环境微生物同普通环境微生物的营养代谢类型、营养生理需求有比较大的差异, 所以嗜盐放线菌的分离不是简单的用普通的培养基加 NaCl 就能实现的。利用唐蜀昆^[15]等推荐 3 种嗜盐放线菌的分离培养基, 从即墨市田横镇泊子盐场样品中共分离到 15 株可培养放线菌。从图 1 可以看出, 不同培养基获得放线菌的数量和种类有很大的差异。其中有 9 株放线菌从 M1 中分离, 6 株从 M2 中分离, M3 中没有分离出放线菌, 分离到放线菌菌株数目最多的培养基为 M1; 从图 1 也可以看出, M1 和 M2 从盐池样品中分别分离到 2 个属和 3 个属的放线菌; 从分离到的放线菌种类和数量上看, M2 从高盐环境中分离放线菌效果较好。

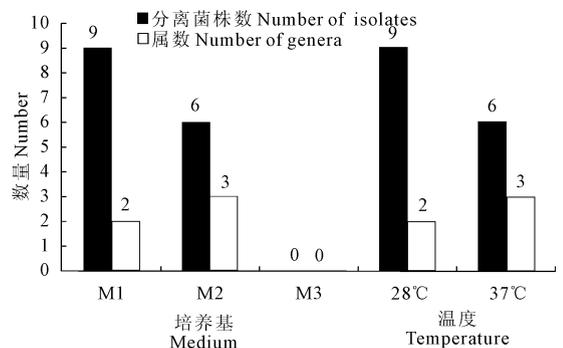


图 1 培养基和温度对放线菌分离的影响

Fig. 1 The effect of medium and temperature on actinomycetes isolation

菌株 CXB832 细胞壁主要含有异—二氨基庚二酸、葡萄糖和木糖;极性酯主要为双磷脂酰甘油、磷脂酰甘油、磷脂和糖脂;醌主要含有 MK-10(H₈)(32%),MK-9(H₈)(29%),MK-10(H₂)(20%)和

MK-10(H₆)(17%)。

经 HPLC 法测得 CXB832 的 G + C 含量为 601 mmol。

表 1 盐池样品中分离菌株的同源性比对和产酶特征

Table 1 The homology comparison and enzyme-producing characteristics of the isolation of actinomycetes from salt pond

菌株编号 Strains No.	最近菌株 Closest match	相似性/% Similarity	淀粉酶 Amylase	蛋白酶 Protease	酯酶 Esterase	纤维素酶 Cellulase
CXB831	<i>Haloactinospira alba</i>	94.9	-	-	+	-
CXB832	<i>Haloactinospira alba</i>	94.9	-	-	+	-
CXB833	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	99.7	+	-	-	+
CXB836	<i>Streptomyces rubidus</i>	99.7	+	-	-	-
CXB837	<i>Streptomyces rubidus</i>	99.6	+	-	-	-
CXB838	<i>Streptomyces thinghirensis</i>	99.2	+	+	-	-
CXB839	<i>Nocardiopsis aegyptia</i>	99.2	-	-	+	-
CXB841	<i>Streptomyces rubidus</i>	99.6	+	-	-	-
CXB842	<i>Streptomyces rubidus</i>	99.7	+	-	-	-
CXB865	<i>Streptomyces flocculus</i>	99.4	+	-	-	-
CXB869	<i>Streptomyces thinghirensis</i>	99.9	+	+	-	-
CXB877	<i>Streptomyces sclerotialus</i>	99.6	+	-	-	-
CXB888	<i>Streptomyces sclerotialus</i>	99.2	+	-	-	-
CXB889	<i>Streptomyces sclerotialus</i>	99.8	+	-	-	-
CXB891	<i>Streptomyces flocculus</i>	99.5	+	-	-	-

注：“+”，阳性；“-”，阴性。

Note: “+”，Positive;“-”，Negative.

3 讨论

盐环境的离子类型较多,主要有 8 种离子: Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Cl⁻、SO₄²⁻、CO₃²⁻、HCO₃⁻,长期栖息在那里的放线菌必然对不同离子及其不同浓度产生了选择性适应。在本研究中,培养基 M1 和 M2 中分别含有 20% MgCl₂ 和 15% NaCl,所以从 M1 和 M2 分离的放线菌分别对 Mg⁺ 和 Na⁺ 具有一定的耐受性;另外,长期以来用单一类型的盐 NaCl 来分离嗜盐放线菌,限制了对嗜盐放线菌的认识,唐蜀昆等^[15]研究表明,一定比例的复合盐能大幅度提高嗜盐放线菌的出菌率,但在本研究中含有一定比例复合盐的 M3 培养基并没有分离出放线菌,原因可能是多方面的,比如复合盐的比例问题,因为不同盐环境中 8 种离子的组成和比例有较大的差异,本研究所用的复合盐比例(NaCl:KCl:MgCl₂ = 4:4:1)可能与研究样品环境中实际存在离子的组成和比例有很大差异,所以放线菌不能适应这样的分离环境,导致 M3 培养基并没有分离出放线菌。比较 M2 和 M3 的营养成分,Ca²⁺ 浓度是两种培养基的主要差别,M2 分离效果比较好,M3 却没有分离出放线菌,有可能是分离高盐环境中放线菌时,Ca²⁺ 浓度超过一定范

围会抑制放线菌的生长,具体机制有待进一步研究。另外,嗜盐放线菌的分离存在明显的温度效应,37℃ 更有利于从盐环境中分离出更多种类的放线菌。从盐环境中分离嗜盐放线菌,首先应尽可能地模拟盐环境条件,其次必须要综合考虑特殊的分离条件(一定的盐浓度、一定比例的复合盐、某一温度)、特殊的营养需求(适宜的培养基)等多种因素。

一般来讲,5% NaCl(w/v)分离到的大多是耐盐 *Streptomyces* 属,10% NaCl 分离的大多数也是耐盐放线菌,以 *Nocardiopsis* 属占优势,还有少量 *Streptomyces* 属,15% 或以上 NaCl 分离到的多数菌株为嗜盐放线菌,这些分离菌株中,主要以稀有放线菌为主^[15]。吕志堂等^[16]对沧州地区高盐环境中放线菌多样性进行研究,发现用 10% 和 20% NaCl 分离到的嗜盐放线菌主要类群是 *Nocardiopsis* 属和 *Streptomyces* 属,另外还发现纤维单胞菌科一新属。但在本研究中,15% NaCl 分离到的多数菌株属于 *Streptomyces* 属,少数属于 *Nocardiopsis* 属,另外还发现一个新属。关统伟等^[17]在对新疆塔里木盆地可培养嗜盐放线菌多样性研究发现,用 15% NaCl ~ 20% NaCl 分离到塔里木盆地高盐环境中嗜盐放线菌的优势类群是 *Actinopolyspora* 属(38.9%)、*Nocardiopsis* 属

(27.8%)和 *Streptomonospora* 属(22.2%),并发现一个新属。曹兰兰^[18]等从新疆哈密地区盐湖土样中分离得到63株放线菌,分属于6科8个属,链霉菌属为优势菌属,其次是拟诺卡氏菌属,并通过延长培养时间获得了一些稀有放线菌,如糖丝菌属(*Saccharothrix*)、姜氏菌属(*Jiangella*)、链单孢菌属(*Streptomonospora*)。虽然在不同的高盐环境中存在放线菌的优势类群有差异,但均有较为丰富的嗜盐放线菌系统发育多样性,并且潜藏着新的放线菌资源。

从泊子盐池分离的15株放线菌中,每株菌都至少具有一种酶活性,产酶多样性比较丰富。这与曹兰兰^[18]等对新疆哈密地区盐湖放线菌的功能酶的筛选研究结果相似,在63株供试放线菌中,有3株放线菌产蛋白酶、46株产淀粉酶、14株产酯酶、34株产半乳糖苷酶、5株产纤维素酶。目前对高盐环境中放线菌的研究主要是针对嗜盐放线菌分布、多样性及新菌资源,但对其功能研究的较少,通过本研究发现泊子盐场中存在的放线菌在工业微生物酶制剂等方面具有研究价值。

随着生物技术的发展,分离技术得到一定的发展,近期一些盐湖环境的放线菌新类群(*Streptomonospora halophila*^[19]、*Haloactinopolyspora alba*^[20]、*Myceligenersans salitolerans*^[21]等)也不断地被发现。本研究中菌株CXB832的16S rDNA序列与已描述的其他放线菌种类相似性<97%,并根据其表型和分子特征,可推出菌株CXB832是Nocardiopsaceae科中未曾描述的新属。研究结果同时也说明高盐环境是分类新物种的重要来源。嗜盐微生物的研究是一个比较新的领域,在嗜盐放线菌的研究上,我国和国外处于同一个起跑线上。现今,欧美、韩国、日本等国都在抓紧这方面的研究,从极端环境中发现大量的新物种以及特殊代谢产物。我国拥有丰富的自然资源,深入系统的研究极端环境下的微生物资源,对保护、开发、利用我国极端环境中的微生物资源具有重要的意义。

参考文献:

[1] 马延和.新的生命形式-极端微生物[J].微生物学通报,1999,26:80.
 [2] 张永光,李文均,姜成林,等.嗜盐放线菌的研究进展[J].微生物学杂志,2002,22(4):45-48.
 [3] Nyssola A, Kerovu J, Kaukinen P, et al. Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation[J]. Biological Chemistry, 2000,275(29):22196-22201.
 [4] Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of streptomycetes

species[J]. International Journal Systematic Bacteriology, 1966,16:313.
 [5] Sánchez-Porro C, Martín S, Mellado E, et al. Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes [J]. Journal of Applied Microbiology, 2003,9(4):295-300.
 [6] Casaburi A, Villani F, Toldrú F, et al. Protease and esterase activity of staphylococci[J]. International Journal of Food Microbiology, 2006,3:223-229.
 [7] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes[J]. J Gen Appl Microbiol, 1983,29:319-322.
 [8] Lechevalier H A, Lechevalier M P. The chemotaxonomy of actinomycetes[C]//Dietz A, Theayer D W. Actinomycete taxonomy(1st edition). Arlington Va: Special Publication no. 6. Society for Industrial Microbiology, 1980.
 [9] 吕志堂.假诺卡氏菌科的多相分类研究[D].北京:中国科学院微生物研究所,1999.
 [10] Collins M D. Analysis of isoprenoid quinines[C]//Gottschalk G. Methods in microbiology, vol. 18 (1st edition). London: Academic Press, 1985.
 [11] Mesbah M, Whitman WB. Measurement of deoxyguanosine/thymidine ratios in complex mixtures by high-performance liquid chromatography for determination of the mole percentage guanine + cytosine of DNA [J]. J Chromatogr, 1989,479:297-306.
 [12] Lee YK, Kim HW, Liu CL, et al. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials[J]. J Microbiol Methods, 2003,52:245-250.
 [13] 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]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007,57:2259-2261.
 [14] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007,24:1596-1599.
 [15] 唐蜀昆,姜怡,职晓阳,等.嗜盐放线菌分离方法[J].微生物学通报,2007,34(2):390-392.
 [16] 吕志堂,张利平,李艳华,等.沧州高盐环境嗜盐放线菌多样性研究[J].河北大学学报(自然科学版),2006,26(1):1-6.
 [17] 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] 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.
 [19] Cai M, Zhi X Y, Tang S K, et al. Streptomonospora halophila sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from a hypersaline soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008,58(7):1556-1560.
 [20] Tang S K, Zhi X Y, 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]. Int J Syst Evol Microbiol, 2011,61(1):194-200.
 [21] Guan T W, Wu N, Tang S K, et al. Myceligenersans salitolerans sp. nov., a halotolerant actinomycete isolated from a salt lake in Xinjiang, China[J]. Extremophiles, 2013,17(1):147-152.