

土壤放线菌分离与 16S rDNA 系统发育分析

李永欣, 张 栋, 张晓瑜, 郭立格, 张利平*

(河北大学 生命科学学院/河北省微生物多样性研究与应用实验室, 河北 保定 071001)

摘要: 为探讨燕山山脉土壤中可培养放线菌的物种多样性, 建立该区域放线菌资源信息库, 采用稀释涂布平板法对燕山山脉的 26 份土壤样品进行了放线菌的分离纯化, 根据菌落表型共分离到 1 055 株分离物, 并随机挑选其中 200 株进行初步鉴定。首先采用链霉菌属(*Streptomyces*)的特异引物对分离物 DNA 进行 PCR 扩增, 从而快速鉴定分离物是否属于链霉菌属, 然后对其余的分离物进行 16S rDNA 序列分析。结果表明, 随机挑选的 200 株放线菌分属于 19 个属, 其中哈马达菌属(*Hamadaea*)为我国首次报道。16S rDNA 系统发育分析结果表明, 菌株 Y0450-41 与哈马达菌属模式种的 16S rDNA 序列相似性为 97.3%, 是哈马达菌属的一个潜在新种; 菌株 Y0371-4 与其系统发育关系最近已知种特殊链霉菌(*Streptomyces specialis*)的 16S rDNA 序列相似性为 95.5%, 可能代表着一个潜在的新属。

关键词: 燕山山脉; 土壤; 放线菌; 16S rDNA

中图分类号: Q939.13⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)03-0075-06

Separation of Soil *Actinomycetes* and 16S rDNA Phylogenetic Analysis

LI Yong-xin, ZHANG Dong, ZHANG Xiao-yu, GUO Li-ge, ZHANG Li-ping*

(Key Lab of Microbial Diversity Research and Application of Hebei Province/College of Life
Science, Hebei University, Baoding 071001, China)

Abstract: In order to analyze the diversity of species of cultivable *Actinomycetes* in the soil of Yanshan mountains, and establish *Actinomycetes* resources information database of this region, the separation and purification of *Actinomycetes* from 26 soil samples in Yanshan mountains was done by the dilution coated plate method. According to the colony phenotype, 1 055 strains were isolated, and 200 strains randomly selected were identified. First, the specific primers of *Streptomyces* was used to identify the isolates, for the other isolates, identification was done using 16S rDNA phylogenetic analysis. The results indicated that the strains belonged to 19 genera, and *Hamadaea* was found the first time in China. The similarity between strain Y0450-41 and type species of *Hamadaea* reached 97.3%, which is a potential new species of *Hamadaea*. The similarity between strain Y0371-4 and *Streptomyces specialis* was 95.5%, and it may belong to a potential new genus.

Key words: Yanshan mountains; soil; *Actinomycetes*; 16S rDNA

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30970010)

作者简介: 李永欣(1986-), 女, 河北石家庄人, 在读硕士研究生, 研究方向: 微生物资源保护与利用。

E-mail: xin584548476@163.com

* 通讯作者: 张利平(1956-), 女, 河北保定人, 教授, 博士, 主要从事微生物资源保护与利用及微生物遗传育种研究。

E-mail: zhlping@hbu.edu.cn

放线菌是一类具有重要药用价值的微生物资源,为人类做出了巨大贡献。目前临床和农牧业上应用的抗生素有 3/5 以上是由放线菌产生的^[1]。但是近年来从放线菌中发现新生物活性物质的几率越来越低,要解决这个问题,必须开发新微生物资源,研究分离方法,其中开发新微生物物种资源是核心。生态环境中还有大量的放线菌资源未被人们所认识。近年来,有学者从一些原始生态环境中发现了大量放线菌新类群^[2-3],这表明要想获得新的放线菌资源必须选择特殊的生态环境采集样品。

燕山山脉是河北省境内著名山脉之一,位于 39°40′~42°10′N、115°45′~119°50′E,南临华北平原、东濒渤海、西连黄土高原、北接蒙古高原,是华北平原向蒙古高原过渡的区域^[4]。特殊的地理位置和

温带大陆性季风气候及丰富多样的生态环境不仅造就了燕山山脉中山、低山、丘陵、盆地、山谷等特殊的地貌形态,也为该区域的放线菌提供了特殊的栖息地,定居于此地区土壤中的放线菌必然具有鲜明的特点,但是目前对该区域放线菌的分离研究尚属空白。为此,对燕山山脉土壤放线菌进行分离,并对其进行 16S rDNA 系统发育分析,以期放线菌生物资源的开发和利用及新药开发研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 2010 年 10 月从燕山山脉不同地区采集土样(表 1),在深度为 10、20 cm 处分别取样,然后等比例混合。运回实验室后-4℃保藏备用。

表 1 样品来源

样品编号	采集地点	地理位置	气候特征	
			年平均温度/℃	年平均降水量/mm
# 0281	北京树林地	40°53.5′N、116°36.9′E	12.1	525
# 0291	北京草地	40°36.0′N、116°40.0′E		
# 0290	北京农田地	40°38.6′N、116°38.8′E		
# 0296	北京山脚下	40°37.5′N、116°46.5′E		
# 0371	赤峰县树林地	42°00.7′N、118°58.8′E	6.4	440.1
# 0366	赤峰县草地	42°01.5′N、118°46.6′E		
# 0367	赤峰县土沟	42°03.9′N、118°46.7′E		
# 0541	密云县山脚下	40°22.7′N、117°05.8′E	10.8	661.3
# 0540	密云县树林地	40°23.5′N、117°06.1′E		
# 0539	密云县农田地	40°24.7′N、117°08.6′E		
# 0537	密云县裸土地	40°25.1′N、117°12.9′E		
# 0536	密云县荒地	40°25.1′N、117°13.7′E		
# 0446	平泉山根下	40°44.5′N、118°35.0′E	7.7	523.8
# 0450	平泉树林地	40°52.8′N、118°39.7′E		
# 0451	平泉农田地	40°55.0′N、118°39.6′E		
# 0165	围场草地	42°00.0′N、117°38.2′E	5.6	435.3
# 0174	围场山脚下	42°02.5′N、117°44.5′E		
# 0176	围场荒地	42°03.0′N、117°59.0′E		
# 0421	承德县草地	40°39.0′N、117°37.9′E	7.5	650
# 0417	承德县山脚下	40°41.7′N、117°41.1′E		
# 0418	承德县树林地	40°44.7′N、117°43.1′E		
# 0420	承德县农田地	40°41.3′N、117°41.8′E		
# 0046	赤城荒田地	41°01.1′N、116°04.2′E	6.5	417.8
# 0048	赤城农田地	41°12.4′N、116°04.1′E		
# 0050	赤城树林地	41°14.4′N、116°04.6′E		
# 0051	赤城山脚下	41°08.8′N、116°08.1′E		

1.1.2 分离培养基 采用以下 4 种分离培养基: G⁺ 培养基^[1]、R2A 培养基^[5]、高氏一号培养基^[6]、甘油-天门冬酰胺培养基(ISP5)^[7]。

1.2 方法

1.2.1 放线菌的分离纯化 取土样 5 g,自然风干,

研磨过筛,加入 45 mL 含有 20%CaCO₃ 和 1%苯酚的溶液中,28℃摇床振荡 0.5 h,稀释涂布于含 100 mg/L 制霉菌素和 50 mg/L 萘啶酮酸的 G⁺、R2A、高氏一号、ISP5 4 种分离培养基上。28℃培养 2 周后挑取菌落,尽量避免挑选培养表型一样的菌落。

1.2.2 链霉菌属的快速鉴定 采用酚氯仿法^[8-9]并加以改良提取分离物 DNA,采用链霉菌特异引物进行 PCR 扩增,特异引物正向序列为 5'-CTCCG-GCGGTGMAGGATGAG-3';反向序列为 5'-GTAYACCGACCACAAGGGG-3'。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳,在 840 bp 处出现明亮条带者为阳性,无条带出现者为阴性^[10]。

1.2.3 放线菌 16S rDNA 系统发育分析 对于未被鉴定为链霉菌属的分离物采用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增,16S rDNA 引物正向序列(27f)为 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3',反向序列(1525r)为 5'-AGAAAGGAGGTGATC-CAGCC-3'。将扩增产物送三博生物技术公司测序,测定的序列在 NCBI 上通过 BLAST 与 GenBank 中的序列进行比对,获得相应菌属的 16S rDNA 序列,构建系统发育树,用 EZTaxon server 2.1 进行序列比对得出与相近菌属的相似性数值。采用

BioEidt 软件的 Clustal W 进行多序列匹配排列,利用 MEGA 4.1^[11]软件中的邻接法(Neighbor-joining)构建系统发育树并分析其系统发育地位。定义 16S rDNA 基因序列相似性低于 98%、DNA 同源性小于 70%作为不同的分类单元,相似性大于 98%的归于同一个物种^[12-13]。

2 结果与分析

2.1 放线菌的分离纯化

从表 2 可以看出,采用 4 种分离培养基对燕山山脉的 26 份土壤样品进行放线菌分离纯化,共得到 1 055 株分离物。其中,从 G⁺分离培养基分离到的数目较其他 3 种培养基多,为 456 株,占总数的 43%,G⁺分离培养基不仅出菌率高,而且多样性丰富。主要原因是采用的土壤提取液与土壤放线菌天然的生存环境近似,有利其生长,从而提高了出菌率。这与以前的报道结果一致^[5]。

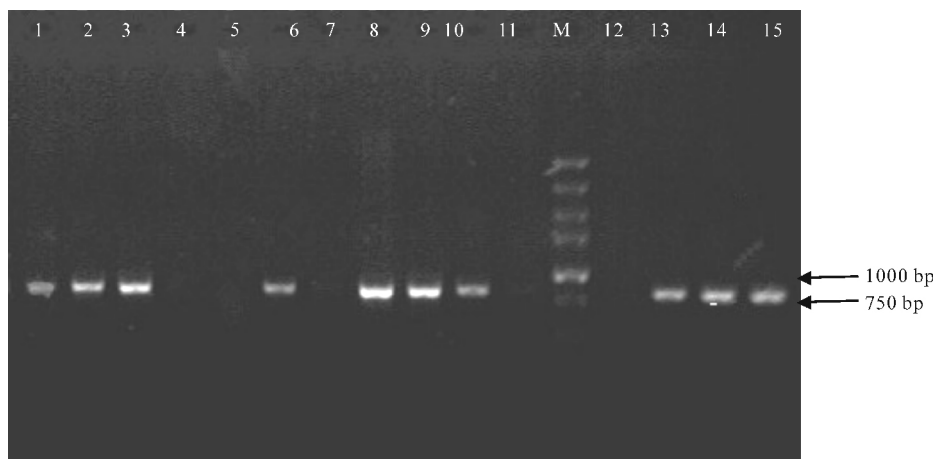
表 2 不同土样中放线菌的分离数目 株

序号	样品编号	培养基				总数
		G ⁺	R2A	高氏一号	ISP5	
1	# 0281	14	10	5	4	33
2	# 0291	10	2	2	1	15
3	# 0290	24	15	15	10	64
4	# 0296	7	3	3	0	13
5	# 0371	20	14	16	6	56
6	# 0366	35	18	18	17	88
7	# 0367	24	18	10	12	64
8	# 0541	10	6	4	4	24
9	# 0540	20	10	13	7	50
10	# 0539	21	20	16	10	67
11	# 0537	15	10	7	8	40
12	# 0536	15	10	11	7	43
13	# 0446	14	3	4	4	25
14	# 0450	16	10	7	4	37
15	# 0451	15	11	8	12	46
16	# 0165	27	8	6	5	46
17	# 0174	8	2	0	0	10
18	# 0176	30	14	12	10	66
19	# 0421	26	16	15	10	67
20	# 0417	10	4	2	4	20
21	# 0418	13	12	6	4	35
22	# 0420	24	16	8	4	52
23	# 0046	13	5	3	1	22
24	# 0048	21	5	2	5	33
25	# 0050	17	7	3	4	31
26	# 0051	7	1	0	0	8
合计	26	456	250	196	153	1 055

2.2 放线菌的鉴定

2.2.1 快速鉴定 随机选取了 200 株分离物通过链

霉菌特异引物进行 PCR 扩增,47 株分离物直接被鉴定为链霉菌属(*Streptomyces*),结果如图 1 所示。



M, Marker; 1—15, 分离物

图 1 部分分离物链霉菌特异引物 PCR 扩增结果

2.2.2 系统发育分析 未被快速鉴定为链霉菌属(*Streptomyces*)的 153 株分离物通过 16S rDNA 序列系统发育分析表明,除 1 株属于链霉菌属(*Streptomyces*)外,其余 152 株分离物分别属于小单孢菌属(*Micromonospora*)、马杜拉菌属(*Actinomadura*)、野野村菌属(*Nonomuraea*)、链孢菌属(*Catellatospora*)、链孢囊菌属(*Streptosporangium*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、珊瑚状放线菌属(*Actinocorallia*)、拟无枝菌酸菌属(*Amycolatopsis*)、放线菌属(*Actinomyces*)、农霉菌属(*Agromyces*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、糖霉菌属(*Glycomyces*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)、哈马达菌属(*Hamadaea*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、球孢囊菌属(*Sphaerisporangium*)、植生放线菌属(*Actinophytocola*)。其中,*Micromonospora* 和 *Actinomadura* 分别占到了 31%和 17%。除了常见的放线菌还分离到一些稀有的放线菌属:*Hamadaea* (1%)、*Actinophytocola* (3%),其中 *Hamadaea* 是在我国首次发现的。200 株分离物属于放线菌目(*Actinomycetales*)的 9 个亚目,11 个科,19 个属。

另外,Y0165-30 等 5 株菌株与其各自相近已知菌株的 16S rDNA 序列相似性均接近 97%(表 3),可能是潜在的新种。由图 2 可以看出,菌株 Y0371-4 以较高的自展值在属中形成一个分支,与其系统发育关系最近的已知种特殊链霉菌(*Streptomyces specialis*)的 16S rDNA 序列相似性为 95.5%,且该菌株未能出现链霉菌特异引物扩增条带,说明菌株

Y0371-4 与链霉菌属的已知菌株之间存在较大的差异,可能代表着一个潜在的新属。菌株 Y0165-30、Y0450-41、Y0174-7 和 Y0539-62 也分别独立于各自系统发育关系最近的已知种而成为独立的分支,因此,这 4 株菌可能代表着分属于 4 个不同属的潜在的 4 个新种。这 5 株菌是否属于新的分类单元及分类地位的确定,还需对其进行形态特征、生理生化特征、细胞化学特征以及分子分类等多项分类指征的系统研究。

表 3 潜在新种与最相近菌株的系统发育关系

菌号	最相近菌株号	相似度/%
Y0165-30	<i>Actinomadura citrea</i> DSM 43461	97.2
Y0450-41	<i>Hamadaea tsunoensis</i> IMSNU 22005	97.3
Y0174-7	<i>Nonomuraea roseola</i> DSM 43767	96.6
Y0539-62	<i>Agromyces ulmi</i> XIL01	96.9
Y0371-4	<i>Streptomyces specialis</i> GW41-1564	95.5

3 结论与讨论

本研究表明,燕山山脉放线菌资源较丰富,多样性好,并且存在着一些潜在的新种。从 26 份土样中分离得到的 1 055 株分离物中随机选择的 200 株,归属为 19 个菌属,5 株为潜在新种,1 株可能代表放线菌的一个新属。*Streptomyces*、*Micromonospora*、*Actinomadura* 为燕山山脉一带土壤放线菌中的优势种群。稀有放线菌中的 *Nonomuraea*、*Streptosporangium*、*Nocardia* 等放线菌在燕山山脉一带也

比较常见。其中, *Actinocorallia* 曾在我国宽城地区首次被分离到^[14], 而在燕山山脉也有分布。 *Actinophytocola* 是近年来由印度学者发现的新属^[15], *Hamadaea* 是由日本 Ara 等在 2008 年建立的小单孢菌科的一个属^[16], 也都在燕山山脉土壤中被发现。 *Hamadaea* 至今只发表了 1 个合格的模式种都

浓哈马达氏菌(*Hamadaea tsunoensis*), 根据 16S rDNA 系统分类分析结果, 菌株 Y0450-41 与都浓哈马达氏菌的序列相似度为 97.3%, 是哈马达菌属(*Hamadaea*)的一个潜在新种; 菌株 Y0371-4 与其系统发育关系最近种 *Streptomyces specialis* 之间也存在较大差异, 可能是一个潜在的新属。

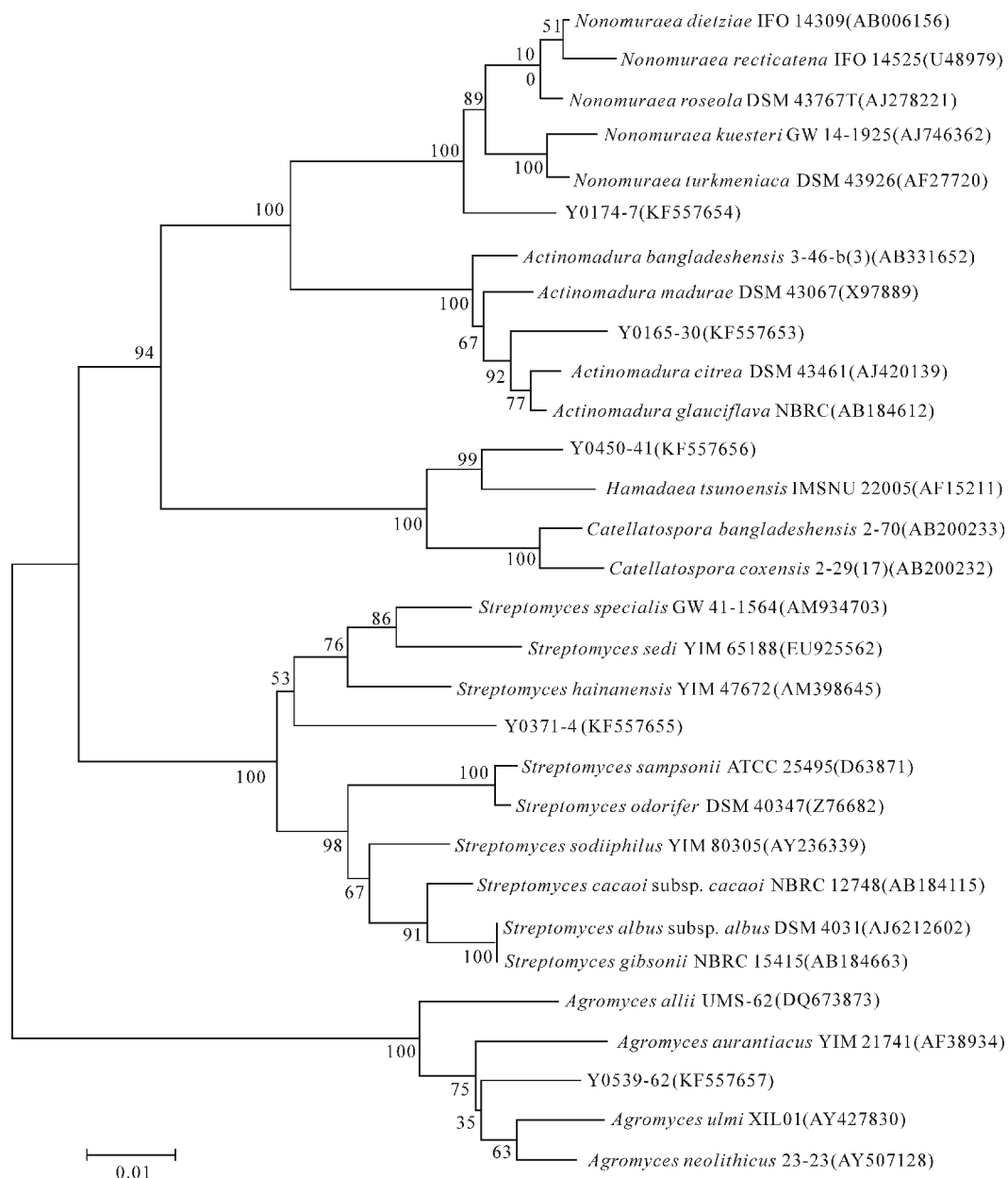


图 2 部分分离物与相关已知属种的菌株基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树

参考文献:

- [1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites: A personal view[J]. *Journal of Antibiot*, 2005, 58(1): 1-2.
- [2] 曹艳茹, 姜怡, 陈义光, 等. 武陵山放线菌多样性[J]. *微生物学报*, 2008, 48(7): 952-958.
- [3] 关统伟, 吴晋元, 唐蜀昆. 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.
- [4] 赵良平. 燕山山地森林植被恢复与重建理论和技术研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2007.
- [5] Zhang J, Zhang L. Improvement of an isolation medium

- for actinomycetes[J]. Modern Applied Science, 2011, 5 (3): 124-127.
- [6] Kawai M, Matsutera E, Kanda H, *et al.* 16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gelelectrophoresis [J]. Appl Environ Microb, 2002, 68(2): 699-704.
- [7] 黄苛, 刘祝祥, 陈奇辉, 等. 具抗菌活性放线菌菌株 JSM20.1 的分离和鉴定[J]. 微生物学杂志, 2010, 30 (1): 21-27.
- [8] Paabo S, Wilson A C. Polymerase chain reaction reveals cloning artifacts[J]. Nature, 1988, 334: 387-388.
- [9] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406-425.
- [10] 张洪伟, 张利平, 张秀敏. 放线菌快速检测方法的反应体系及反应条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2010, 38 (4): 5539-5541.
- [11] 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.
- [12] Stach J E, Maldonado L A, Masson D G, *et al.* Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 6189-6200.
- [13] Kasai H, Tamura T, Harayama S. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from gyrB-based phylogeny and DNA relatedness[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(1): 127-130.
- [14] 熊亚男, 杨润蕾, 宋丽华, 等. 承德地区放线菌物种多样性分布的研究[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28 (4): 77-78.
- [15] Indananda C, Matsumoto A, Inahashi Y, *et al.* *Actinophytocola oryzae* gen. nov. sp. nov., isolated from the roots of Thai glutinous rice plants, a new member of the family Pseudonocardiaceae[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60: 1141-1146.
- [16] Ara I, Bakir M A, Kudo T. Transfer of *Catellatospora koreensis* Lee *et al.* 2000 as *Catelliglobospora koreensis* gen. nov., comb. nov. and *Catellatospora tsunoense* Asano *et al.* 1989 as *Hamadaea tsunoensis* gen. nov., comb. nov., and emended description of the genus *Catellatospora* Asano and Kawamoto 1986 emend. Lee and Hah 2002[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 1950-1960.