



河南师范大学水产学院

College of Fisheries Henan Normal University



读 书 报 告

汇报人：张玲玉

时间：2017-8-19



Insights on the Effects of Heat Pretreatment, pH, and Calcium Salts on Isolation of Rare *Actinobacteria* from Karstic Caves

Bao-Zhu Fang¹, Nimaichand Salam¹, Ming-Xian Han^{1,2}, Jian-Yu Jiao¹, Juan Cheng³, Da-Qiao Wei², Min Xiao^{1*} and Wen-Jun Li^{1,3*}

IF=4.076 (2017)

Contents

1

Abstract

2

Introduction

3

Material & Methods

4

Results

5

Discussion

Abstract

放线菌门是地球上存在最广泛的细菌家族。

云南司岗里洞穴

设置不同的分离条件

稀有放线菌
(链霉菌属除外)

不同温度预处理
培养基的pH、
钙盐浓度

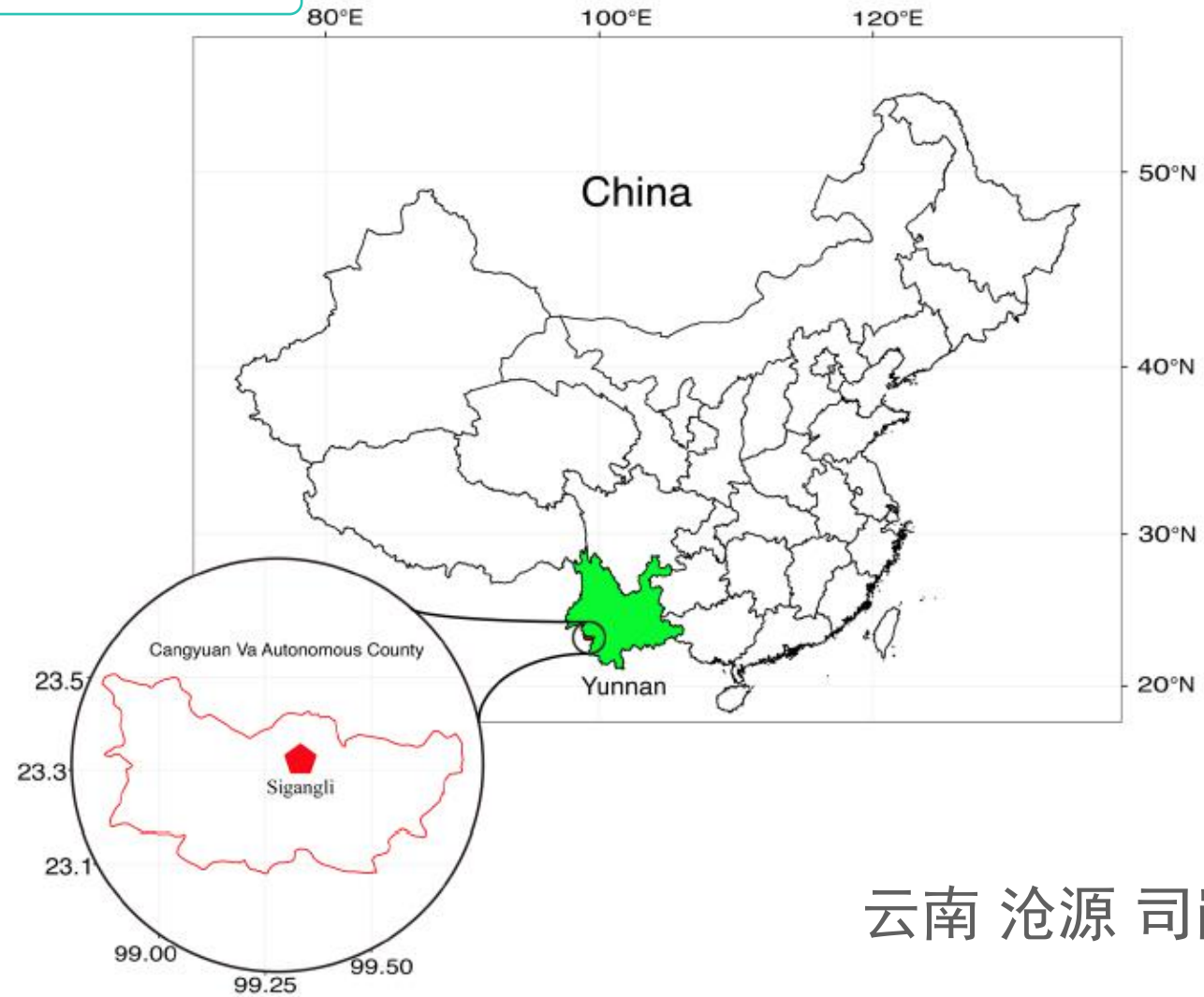
探究不同条件对分离稀有
放线菌的影响。

结果：放线菌门，204个种
隶属于30个属，29个稀有放
线菌属，如纤维菌属、小单
胞菌属、马杜拉放线菌属.....

Introduction

洞穴缺乏光照，有机物输入量少，被认为是极端环境，微生物经过长期的选择和适应，形成了特殊的群落结构和多样性。但99%的微生物尚不能被分离培养，一些生活在极端环境的微生物就更不容易被分离得到。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，而且放线菌不仅在生物降解方面起到重要作用，还参与了生物矿化。基于放线菌的种种价值，笔者对放线菌的分离方法进行研究，期望从洞穴中得到更多的稀有放线菌为人类所用。

Material & Methods



云南 沧源 司岗里洞穴

FIGURE 1 | Geographical location of Sigangli Caves, Yunnan Province, China.

1 样点描述和样品采集

司岗里洞穴：位于云南省沧源县，云贵高原上喀斯特洞穴的一部分。洞穴内设置不同的样点，采集了不同类型的样品。

TABLE 1 | Description of the samples used for isolation.

Samples	Sample form	pH of samples	Sampling date	Sampling site	Coordinates
STRS01	Dark saprolite	7.8		Sigangli	E 99.334'
SST6	Sedimentary rock	7.3			N 23.325'
SS16	Sandy soil	8.3			
SS19	Debris	8.0			
CS7	Arene	8.5	01-04-2013		
CST1	Cave coral	7.1			
YS5	Saprolite	7.5			
CS4	Stony and sandy soil	7.6	02-04-2013		
BS1	Dark saprolite	8.1	03-04-2013		

Type 1 sample: sedimentary rocks , cave coral

Type 2 sample: saprolites, sand, debri , arene

2 放线菌的分离和保存

分离方法如表2（如下）

TABLE 2 | Effects of physiological parameters on isolation of *Actinobacteria*.

S. no.	Physiological conditions for isolation	Pretreatment conditions	Samples for the study	Isolation media used
1	Sample pretreatment methods	(a) Fresh samples w/o pretreatment (b) Air dried in room temperature for 2 weeks (c) Samples kept in oven at 40°C for 2 days (d) Samples kept in oven at 65°C for 4 h (e) Samples heated in oven at 110°C for 1 h (f) Pretreatment e followed by c Isolation media adjusted to pH 6, 7, 8, and 9	SST6 (Type 1), SS19 (Type 2)	HV, ISP5, CC, HP, SC
2	Effect of pH		SS16 (pH 8.3), SS19 (pH 8.0), YS5 (pH 7.5), CS7 (pH 8.5), CS4 (pH 7.6), BS1 (pH 8.1)	CC, HP
3	(a) Preference of calcium salts (b) Concentration of the salts	(a) Isolation media supplemented with one of the three calcium salts $\text{CaCO}_3/\text{CaCl}_2/(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ (b) Concentration of each calcium salts adjusted to 0, 0.01, 0.1, and 1% (w/v)	CST1 (Type 1), STRS01 (Type 2)	B-4, HP, Water agar

不同温度预处理

pH

不同钙盐

培养基类型：HV、ISP5、CC、HP、SC、B4、water agar（分离培养基），YIM38（纯化培养基）。

放线菌保存方法：甘油管（20%）、-80°C，牛奶管（20%），冷冻抽干4°C保存。

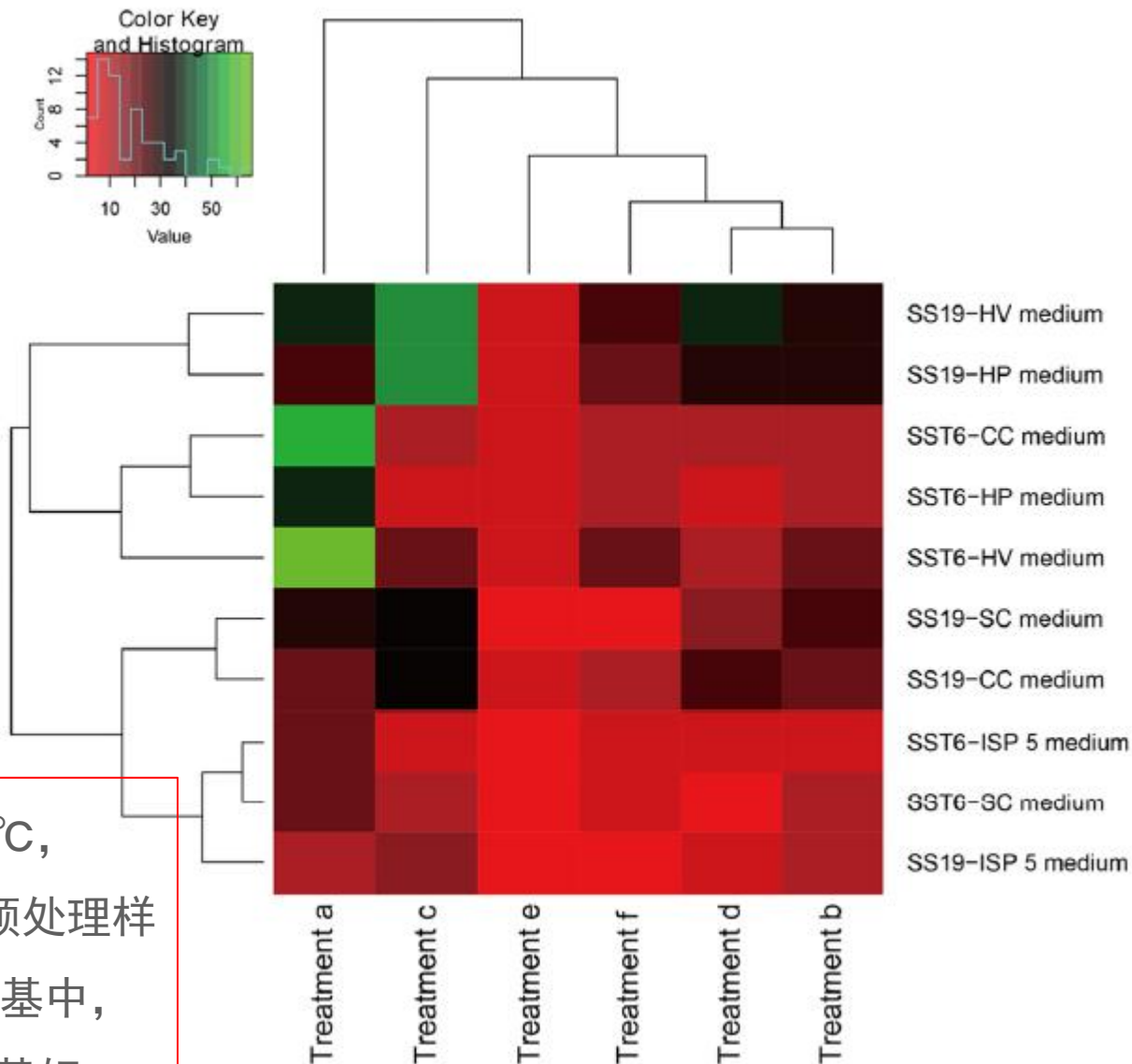
3 DNA提取、PCR扩增、测序：引物 27F、1492R

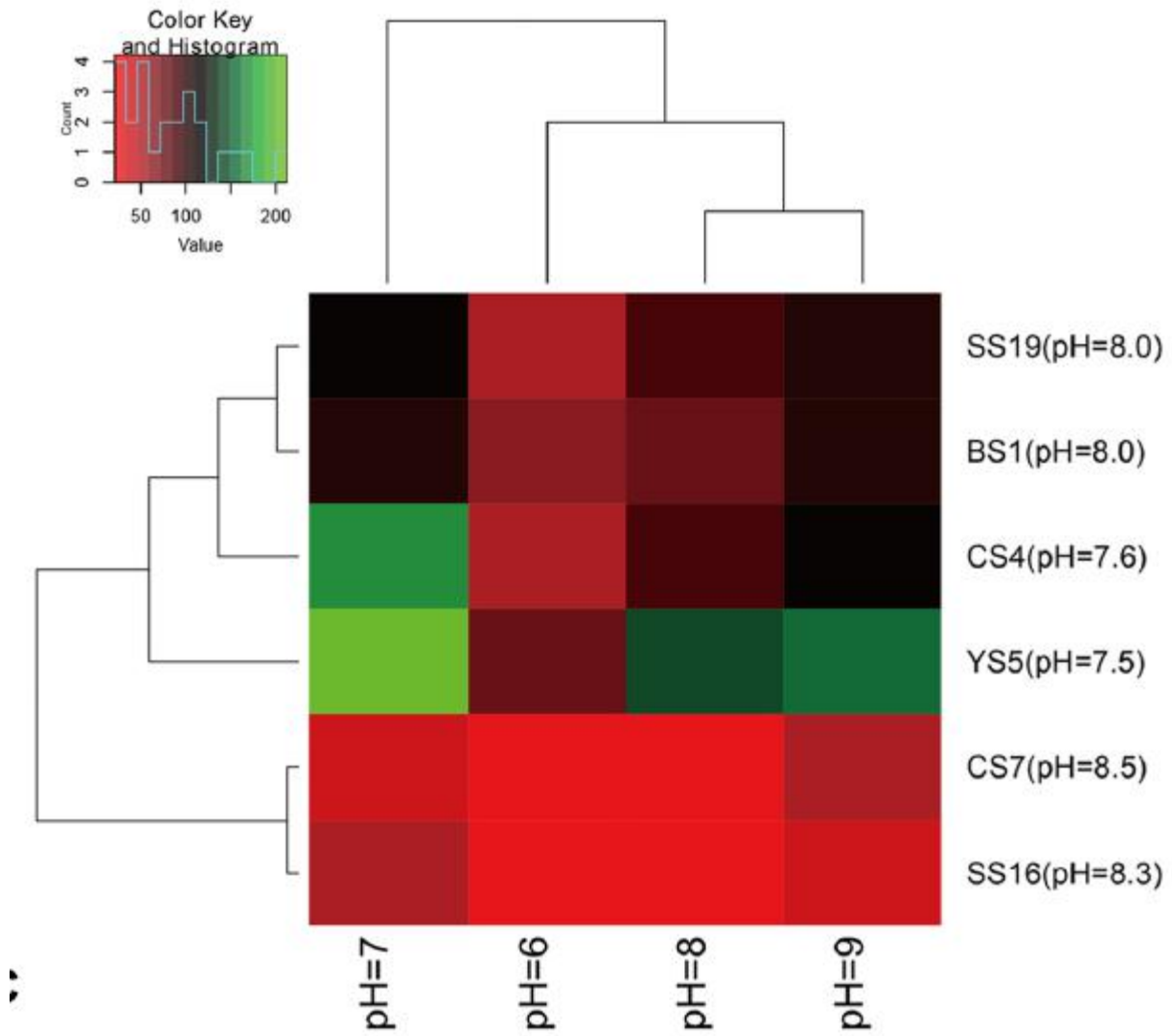
Results

1 温度、pH、钙盐类型对分离放线菌的影响

A 用不同温度对样品进行预处理，SS19 (Type1) SST6 (Type2)。

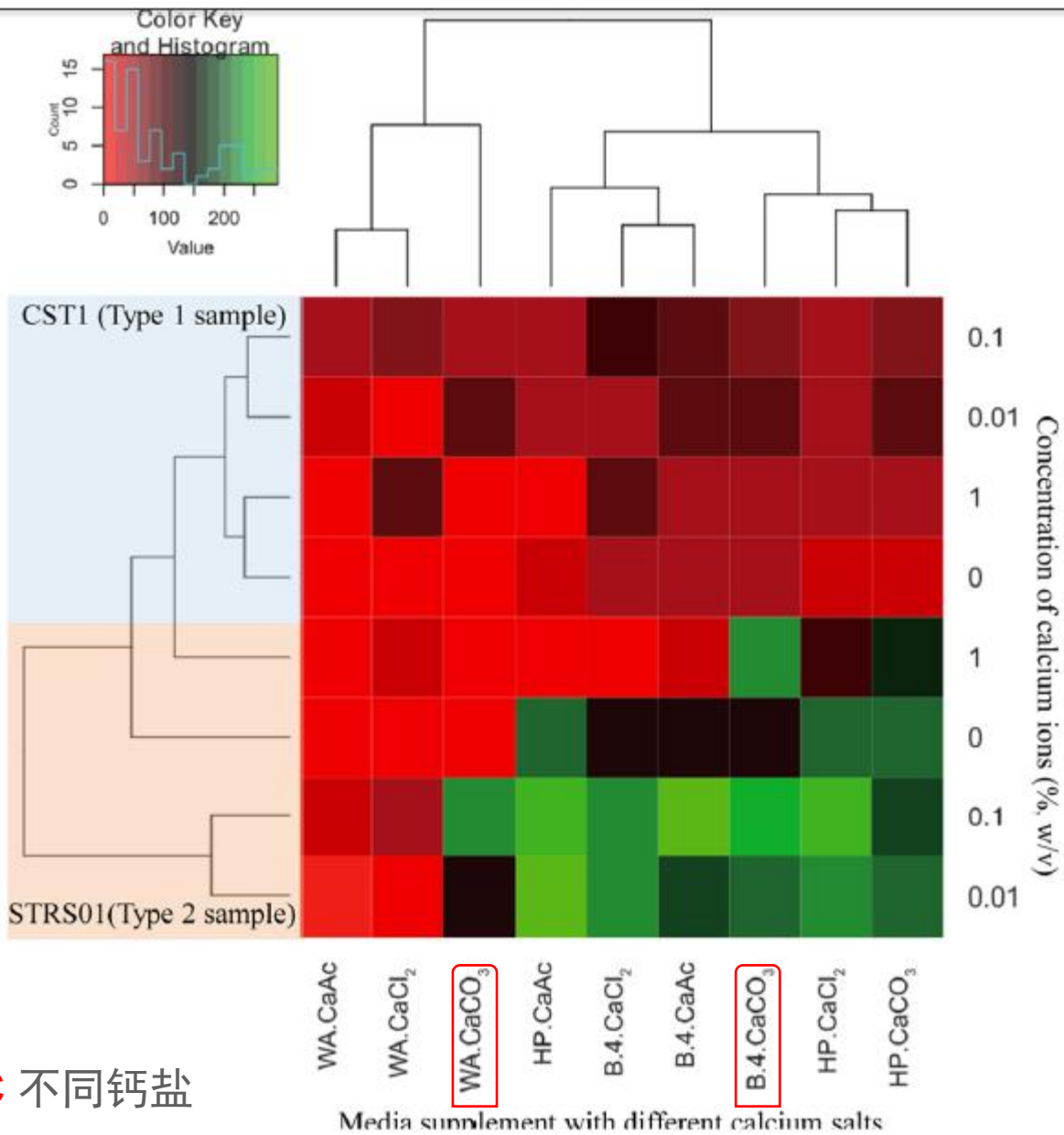
如图所示：TreatmentC (40°C, 2days) 比其他 (def) 高温预处理样品后的分离效果好。5种培养基中，HV的分离效果比其他种培养基好。





B 不同pH

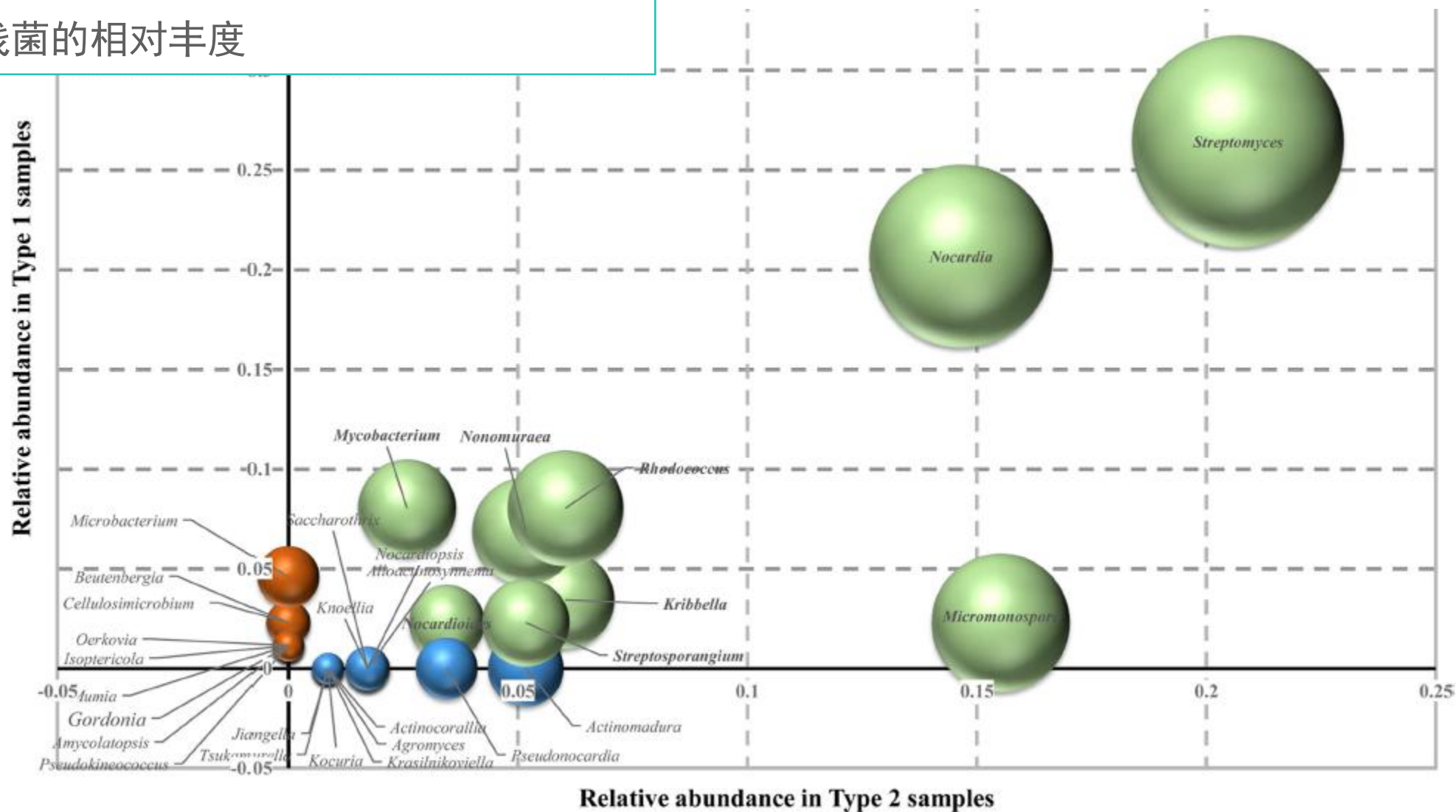
当pH为7或者弱碱性、接近中性时，CFUs数量较多。随着pH的增加，CFUs数逐渐降低。



C 不同钙盐

通过加入不同的钙盐，发现加CaCO₃后能分到更多的放线菌。另外钙盐的浓度也是影响分离效果的重要因素，浓度为0.1%和0.01%时分离效果比较好。

2 稀有放线菌的相对丰度



该图表示洞穴两类样品中稀有放线菌的相对丰度。绿色表示两个类型的样品，红色表示Type1，蓝色表示Type2.球体的大小表示每个属内菌株的多少。

Type1样品：87株，放线菌门：20个属，14个科

Type2样品：217株 放线菌门：21个属，16个科

链霉菌属仍是优势类群，诺卡氏菌属和红球菌属相对丰度较高，在两种类型的样品中都有发现（Type1：18株 *Nocardia*，7株 *Rhodococcus*；Type2：17株 *Nocardia*，7株 *Rhodococcus*）。

Micromonospora（小单包菌属）在Type2中相对丰度较高（19株，Type1 2株）。

Type1、Type2共有的属：*Jiangella*, *Kribbella*, *Nocardioides*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, and *Streptosporangium*

Type1：*Amycolatopsis*, *Beutenbergia*, *Cellulosimicrobium*, *Gordonia*, *Isoptericola*, *Microbacterium*, *Mumia*, *Oerskovia*, *Pseudokineococcus*。

Type2：*Actinocorallia*, *Actinomadura*, *Agromyces*, *Alloactinosynnema*, *Knoellia*, *Kocuria*, *Krasilnikoviella*, *Pseudonocardia*, *Saccharothrix*, *Tsukamurella*。

Discussion

①样品预处理: air drying, dry heating, moist incubation, desiccation。

Air-drying of samples:120°C、1小时, 适用于分离*Dactylosporangium*, *Microbispora*,

Streptosporangium, 而且限制了链霉菌的生长; 100°C、15分钟后可以很好分离马杜拉放线菌属

(*Actinomadura*) ; 室温、一周能有效分离*Herbidospora*; 样品预处理条件为55-65°C, 30分钟时, 能有效分离得到小单胞菌属(Jiang et al., 2016)。基于这些研究本文设计了不同的温度梯度对样品进行预处理, 结果发现低温预处理样品能得到更多的CFUs (Treatmenta), 随着预处理温度的升高, CFUs数逐渐降低, 110°C处理1小时 (Treatmente) 得到的CFUs最少, 但是在e之后又有c(40°C、2天) 处理 (Treatmentf), CFUs又会增多。(图Figure 2A)

2 pH

放线菌对酸碱度有一定的选择性，因为土壤的pH值可以强烈地影响微生物群落的生物量、活性以及结构。所以分离培养基的酸碱度是影响放线菌分离效果的重要因素。

不同于在酸性和潮湿条件下优先生长的真菌，大多数放线菌在弱碱性条件下生长最佳。(Kontro et al.,2005; Lewin et al., 2016).本研究设置了7.5-8.5的pH范围（Table2），结果发现中性pH时，放线菌CFUs数更多（Figure2B）。在碱性分离培养基上，放线菌并没有减少很多，培养基为酸性时，放线菌CFUs数最少。这也可能是放线菌的多少并不受土壤酸碱度的影响，而是受分离培养基酸碱度的限制。

3 不同钙盐

放线菌通常生长在洞穴的岩墙上，在许多的洞穴中，放线菌覆盖在岩壁上能够吸收CO₂ 气体，吸收的气体被细菌用于溶解岩石进而形成碳酸钙晶体(Cañaveras et al., 2001)。在预处理添加碳酸钙进行选择性地分离放线菌，这可能促使放线菌形成孢子(El-Nakeeb and Lechevalier, 1963; Alferova and Terekhova, 1988)。另外在分离培养基中添加氯化钙后可以刺激稀有放线菌Sporichthya(Suzuki et al.,1999)的生长。所以，本研究在分离培养基中加入3种钙盐（碳酸钙、氯化钙、醋酸钙；Figure2C），结果为培养基中钙离子浓度较低(0.1% or -10 mM)的，得到的放线菌比高钙离子浓度(1%, w/v or -0.1 M)或不含钙离子的多，而且添加碳酸钙的分离效果更好。

除了上述因素，分离培养基也是影响分离效果的重要条件。所以分离不同的放线菌要设计不同而分离培养基(Tiwari and Gupta, 2013)。本研究中，设计了7种分离培养基，HV培养基适用于很多放线菌类群的生长，在这一组中发现更多的放线菌CFUs(Figure 2A)。SC和ISP培养基适用于链霉菌属的生长，本研究结果中有大量的链霉菌存在，可能是使用了这两种培养基。CC和HP培养基是笔者实验室专门为分离稀有放线菌而设计的，这次研究结果显示，HP比CC的分离效果更好(Figures 2A,C)。water agar培养基不适用于分离稀有放线菌。

4 局限性

尽管应用了改进的方法得到了很多种放线菌类群，但研究仍具有一些的局限性。

①研究期间，样点的物化参数和不同的矿物与金属的共存性未测量，缺乏这些数据就不能间接的建立放线菌和矿物之间的相互关系。

②研究仅仅局限在放线菌的培养，不利于多样性的研究，以及不能够了解培养基是否适合其细菌的生长。

③分离方法在其他洞穴或生境中不能重复。

THANK YOU .

