

自溶高温放线菌的生物学特性及 16S rDNA 序列分析研究*

田勇强 张云峰 李文军 崔晓龙 徐丽华** 姜成林

(云南大学、云南省微生物研究所 昆明 650091)

摘要 从云南各地土样及温泉水样中分离到多株高温放线菌。对其中的自溶高温放线菌的形态、生理生化特性、细胞化学组分、同工酶谱及 16S rDNA 序列进行了研究,结果表明它们与非自溶放线菌在上述各方面存在着明显差异,分别属于高温放线菌属(*Thermoactinomyces*)和链霉菌属(*Streptomyces*)。同时发现培养基成分、温度、空气湿度对菌株自溶均有显著影响,特别是水分对链霉菌的自溶起着关键作用。

关键词 自溶高温放线菌, 16S rDNA 序列

分类号 Q939.13 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-04-0268-04

A STUDY ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS AND 16S rDNA SEQUENCES OF AUTOLYTIC THERMOPHILIC ACTINOMYCETES

Tian Yongqiang Zhang Yunfeng Li Wenjun Cui Xiaolong
Xu Lihua** Jiang Chenglin

(Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract The autolytic thermophilic actinomycetes were isolated from various soil and hot spring samples in Yunnan. Morphological, physiological characteristics, compositions of cell wall, isozyme patterns and 16S rDNA sequences of a part of them were researched. Based on the test results, the autolytic thermophilic actinomycetes is classified into two genera, *Thermoactinomyces* and *Streptomyces*. Both the autolytic and unautolytic strains are obviously different in morphology, physiology, enzymology and 16S rDNA sequences. The studies on the effect of nutritional and environmental factors on autolysis indicated that the composition of media, temperature and moisture in the air had great influences on autolysis of strains. The moisture in the air is important to autolysis of *Streptomyces*.

Key words Autolytic thermophilic actinomycete, 16S rDNA sequence

高温放线菌最适生长温度一般在 50℃ ~ 60℃,在自然界中分布广泛^[1,2]。为适应高温环境,它们具有独特的遗传机制,能产生许多工业与医药上有用的酶及抗生素^[2],此外还具有生长快,自溶快等良好的工艺性状^[3]。因此高温放线菌的研究有重要的理论意义和实用价值。在云南高温放线菌的研究中,我们发现有许多高

温放线菌具有自溶现象,为此就自溶高温放线菌的形态特征、生理生化特征、细胞化学组分,

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39560004)
Project Granted by National Natural Science Foundation of China (NO. 39560004)

** 通讯联系人
1998-08-04收稿, 1999-01-04修回

同功酶图谱、16S rDNA 核苷酸序列进行了研究,并对自溶高温放线菌的自溶条件作了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

从云南大理和腾冲的温泉,腾冲火山口、大理、怒江坝及祥云等地采集土样,风干后 120℃ 预处理 1h。用营养琼脂、察氏琼脂(分别加入 20mg/L 萘啶酸或 25mg/L 重铬酸钾作为选择性抑制剂)做稀释平板法分离,55℃ 培养 3~7d。用 ISP-2 培养基挑菌。按姜成林等^[4]的方法分离碱性放线菌。模式菌株来源于 ATCC、CCCCM、IFO、NRRL 等菌种保藏中心,部分菌株为本室已发表的模式菌。

1.2 生理生化特征

采用常规方法。

1.3 细胞壁化学组分分析

按 Lechevallier 等的方法制备纯细胞壁^[5],用王平的方法^[6]分析纯细胞壁的氨基酸及全细胞糖类类型。

1.4 同功酶谱

提取酶液后,按 Maurer 等的方法^[7]测定乙醇脱氢酶(ADH; EC1.1.1.1)、超氧化物歧化酶(SOD; EC1.15.1.1)、谷氨酸脱氢酶(GDH; EC1.4.1.4)、苹果酸脱氢酶(MDH; EC1.1.1.37)、6-磷酸-葡萄糖脱氢酶(G6PD; EC1.1.1.49)、脂酶(EST; EC3.1.1.1)。根据酶带的有无记为两态特征,计算相似性,用 UPGMA 法进行聚类分析。

1.5 自溶高温放线菌自溶条件的实验

选用察氏琼脂等 8 种培养基,在不同的温度下培养,观察其自溶情况;用酵母膏-麦芽汁琼脂,检测氧气与水分对自溶的影响;用甘油-门冬酰氨琼脂作基础培养基,检测不同碳、氮源对自溶的影响。

1.6 16S rDNA 的序列分析

按姜成林等的方法^[8]提取 DNA。用 Primer A(5'-CCG TCG ACG AGC TCA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3')和 Primer B(5'-

CCC GGG TAC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC GCA-3')扩增 16S rRNA 基因。

选 Primer A、Primer B 和 Primer 4(5'-AGG GTT GCG CTC GTT G-3'),用 377 PRISM 全自动序列仪测序。用 PAUP3.1 软件排序,用 MEGA 软件中的 NJ 法构建系统进化树。

2 结果与讨论

2.1 自溶高温放线菌的生理生化特性

自溶主要表现在气生菌丝溶解,而基内菌丝不溶解。高温放线菌属的菌株自溶后,在培养基表面形成厚的孢子层,而高温链霉菌自溶后在培养基表面形成黑色的吸水斑。分离到的高温放线菌属菌株中,有 39% 的菌株具有自溶性。温泉中的自溶菌比土壤自溶菌所占比例大,达到 67%。自溶高温放线菌的碳氮源利用谱比非自溶菌更窄,只能利用 D-甘露糖、葡萄糖、苯丙氨酸等少数碳源。自溶高温链霉菌利用果糖、甘露糖、鼠李糖、木糖、不能利用核糖、棉子糖、肌醇、纤维素和尿素,不产生 H₂S。

另外高温自溶放线菌繁殖极快,在高温下(55℃ 以上),菌体自溶以后很快又萌发新的菌丝体。

2.2 自溶高温放线菌的细胞壁化学成分

高温放线菌属菌株均含 meso-DAP,不含甘氨酸。自溶高温链霉菌均含 L-DAP 和 meso-DAP,以 L-DAP 为主,并含有甘氨酸。所有的高温菌株均含半乳糖。它们与典型的高温放线菌属(细胞壁 III 型)和链霉菌属(I 型)菌株存在明显差异。这可能是由于自溶高温放线菌为适应特殊的环境条件,细胞组分发生的变化。这种现象在以前的工作中多次发现过^[9]。细胞壁化学组分的变化与其生活环境相关,而与自溶性无关。从而我们认为,在对放线菌生态的研究中,对放线菌细胞化学组分的分析也应作为一项重要指标。

2.3 自溶高温放线菌的同功酶谱

不同的自溶高温菌间的酶谱差异很小,它

们与非自溶菌的差异显著。自溶高温链霉菌与非自溶中温链霉菌间只有20%的相似性,而自溶高温链霉菌与自溶中温链霉菌差异相对小些,有45%的相似性。

对6种酶的聚类分析(图略)表明,两株自溶高温放线菌属菌株与一株非自溶的高温放线菌属菌株在87%相似性上聚在一起。而4株自溶高温链霉菌在91%相似性上聚在一起,它们与自溶中温链霉菌以及非自溶链霉菌仅有66%的相似性。同功酶图谱不仅反应了遗传上的差异,也反映不同菌株的生理差异。

2.4 自溶高温放线菌的自溶诱导

不同的营养条件对自溶的影响是不一样的。营养越丰富,自溶越易发生。有机培养基对自溶的诱导作用较明显,在酵母膏-麦芽膏培养基上,试验菌生长良好,很快自溶,出现吸水斑。而无机盐淀粉琼脂却未见自溶发生。半乳糖、蔗糖、硝态氮、天冬氨酸、蛋白胨等对自溶的诱导比较明显,而果糖、淀粉、氨基酸和铵盐对自溶的影响较小。

温度对自溶的影响比较显著,低温下自溶高温放线菌与自溶高温链霉菌均不自溶,在生长温度范围内,温度越高,自溶越快。这可能是由于低温对自溶酶活性的抑制,也可能是与自溶相关的基因表达受到抑制。

氧气对自溶不产生明显的影响,而水份对自溶影响显著,它能引起气生菌丝自溶,产生黑色吸水斑。自溶高温放线菌属菌株在有无空气的情况下都能自溶。自溶中温链霉菌对水分比较敏感,环境干燥的情况下,菌丝不自溶,而在潮湿的空气中(如加橡皮塞后水分不能散放,管内湿度大)菌落出现黑色吸水斑,气生菌丝自溶。自溶高温链霉菌在许多培养基上也形成吸水斑,其吸水自溶能力比自溶中温链霉菌强。

2.5 16S rDNA 序列分析

选择8株代表菌株进行16S rRNA全序列测定,与GenBank和EMBL等数据库中调集的相关放线菌的16S rRNA序列进行比较,选定*E. coli*为外群,利用Kimura-2模型^[10]的邻接法(Neighbor-joining)对20个菌株进行分析,构建

系统进化树(图1)。进化树显示,所有链霉菌都

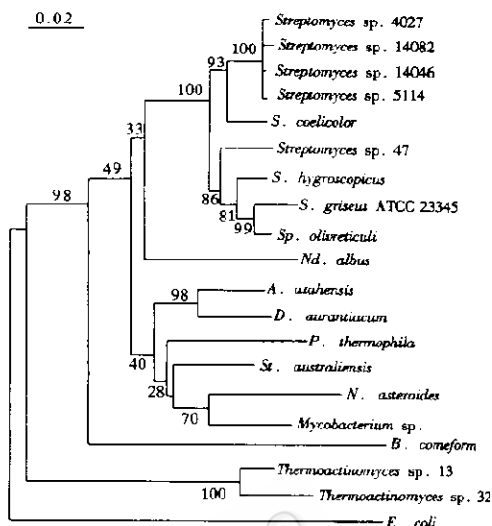


图1 根据16S rDNA序列,用Kimura-2模型构建的NJ(Neighbor-joining)进化树

枝长代表遗传距离,枝长的数字为500次自助抽样再统计得到的该枝的支持百分率。*E. coli*作为外群

聚成一个群,其中4株自溶高温菌(4027, 5114, 14046和14082)聚为一个亚群;它们间的遗传距离很近,相似性为99.52%,以致于在NJ树上没有足够信息将其分开,而形成一四分枝结构。综合其他分类结果,这4株菌同为链霉菌属的一个种^[11]。自溶中温链霉菌47号,和其它3株模式菌聚为一个亚群,而*S. coelicolor*为一个单株亚群。尽管自溶高温链霉菌与自溶中温链霉菌在自溶方式上相似,但它们在16S rRNA序列上的相似性仅为94%,差异明显,应属于不同的种。虽然中温自溶链霉菌47与吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)和其它的链霉菌模式种聚成一个亚群,但它们间的遗传距离相差较远。自溶中温菌47与吸水链霉菌间差异明显,有约84个碱基不同,相异性为5.7%。综合其他分类结果,可划分为不同的种。

高温放线菌属与链霉菌属在系统进化上的差异显著。自溶高温放线菌属菌株13号和非自溶高温放线菌属菌株32号,在NJ树上聚到一起的置信度达100,但其枝长不一样,碱基序列的相异性为7.6%。综合其他分类结果分析,

它们应为同一属的不同种。

在同一属中,高温菌株的16S rDNA的G+C mol%要高出2%~3%,这样就增强了DNA的热稳定性。

综上所述,自溶高温放线菌的分布相当广泛,不仅能从高温环境(如温泉)中分离,也能从非高温环境(如土壤)分离到。由于长期适应高温环境的结果,它们在生理生化特性、细胞壁组分、同功酶谱及遗传等方面发生了明显的变异,与非自溶中温菌差异显著。营养成分、温度和湿度均对自溶产生显著的影响。

致谢 中国科学院昆明动物研究所宿兵和聂龙先生帮助作16S rDNA测序,特此致谢。

参 考 文 献

[1] Jiang C L, Xu L H. *Actinomycetes*, 1993, 4:47~56.

- [2] Cross T. *J Appl Bacteriol*, 1968, 31:36~53.
- [3] Jiang C L, Xu L H, Yang Y R *et al.* *BULL JFCC*, 1992, 8:2~10.
- [4] Jiang C L, Xu L H, Yang Y R *et al.* *Actinomycetol*, 1993,7:58~64.
- [5] Lechevallier M P, Lechevallier HA. *The Chemotaxonomy of Actinomycetes*. Waksman Institute of Microbiology, a university laboratory approach, unpublished, 1980.
- [6] 王 平. *微生物学通报*, 1986, 13(5):228~231.
- [7] Maurer H R. *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, 2nd, 1971, New York.
- [8] 姜成林,徐丽华,许宗雄. *放线菌分类学*,昆明:云南大学出版社,1995,92~104.
- [9] 姜成林,徐丽华,谢桂兰等. *微生物学报*, 1986, 26(2):206~209.
- [10] Kimura M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, 68:454~458.
- [11] Xu L H, Tiang Y Q, Zhang Y F *et al.* *Int J System Bacteriol*, 1998, 48:1089~1093