

四株糖单孢菌分离株的分类学研究*

齐伟红 刘志恒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

提 要 从广西地区的土样中,分离到 4 株细胞壁 IV 型 糖型 A,无枝菌酸的假诺卡氏菌科的放线菌菌株,编号分别为 19.1、22.1、202、和 212。根据 4 株菌的形态学特征和细胞化学特征,将其归入糖单孢菌属。与该属 5 个已知种的 7 个代表株进行的 rDNA 的 BamHI 酶切片段长度类型分析(Ribotyping)的结果表明:19.1 为青绿色糖单孢菌(*S. viridis*),202 为青灰色糖单孢菌(*S. caesia*) 22.1 和 212 为相同的与青绿色糖单孢菌(*S. viridis*)的亲缘关系最近的种,但不同于已知的任何一个种。

关键词 糖单孢菌属,菌株形态,培养特征

分类号 939.11 **文献标识码** A **文章编号** 001-6209(1999)01-0001-07

糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)是由 Nonomura 和 Ohara 1971 年建立的^[1]。1988 年 Embley 等人在研究总结了细胞壁化学 IV 型、糖型 A(含 meso-二氨基庚二酸,阿拉伯糖和半乳糖)无枝菌酸的放线菌类群的系统进化关系后,又将该属划入假诺卡氏菌科(Pseudoncardiaceae)^[2]。目前这个属包括 *S. viridis*, *S. glauca*, *S. azurea*, *S. cyanea* 等 4 个有效种和 *S. caesia* 一个无效发表种。由于这个属中的许多成员产生抗生素、酶等多种生物活性物质,因此从自然基质中分离筛选这类菌株,并对新的分类单位进行分类学研究具有应用和理论意义。本文将报道四株糖单孢菌分离菌株的分类学研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

菌株 19.1、22.1、202、和 212 分离自广西土样,土样采集地及植被特征分别为柳州乔木、广西芭蕉、南宁草地。

菌株 *E. coli* 1.365 和菌株灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*) 4.139 为中国普通微生物菌种保藏中心保藏菌株,分别用于 G+C mol% 测定和醌测定的标准菌株。

菌株 JCM7551 JCM7552 JCM7444 JCM3315 JCM3120 JCM3098 和 JCM3036 为日本菌种保藏中心提供的糖单孢菌属的典型菌株^[3] JCM7551 为天蓝色糖单孢 *S. azurea*, JCM7552 为青色糖单孢 *S. cyanea*, JCM7444 为淡灰蓝色糖单孢 *S. glauca*, JCM3120 和 JCM3098 为青灰色糖单孢 *S. caesia*, JCM3315 和 JCM3036 为青绿色糖单孢 *S. viridis*。

1.2 形态学观察

在燕麦粉培养基^[4]上插片,光学显微镜观察并照相。

* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期:1997-07-25,修回日期:1998-03-03

1.3 培养特征

在三种不同培养基^[5,6]上培养 7~14d, 培养温度分别为 28℃ 和 45℃, 观察并记录培养特征, 颜色记录使用《Color Standards and Color Nomenclature》^[7]。

1.4 生理试验

参考 Gordon 等人^[8,9]报道的方法。

1.5 细胞化学

胞壁类型和糖类型的全细胞分析参考 Lechevalier^[5]和 Hasegawa^[10]的薄板层析法; 枝菌酸全细胞甲基脂分析参考 Minnikir^[11,12]的薄板层析法; 磷酸类脂类型分析参考 Lechevalier^[5]的薄板层析法; 醌类型分析参考 Collins^[13]和吴诚华^[14]的高压液相法。

1.6 DNA G+C mol% 测定

参考 Marmur 和 Delay^[15]的热变性测定法 (T_m 值测定法)。

1.7 Ribotyping-rDNA 限制性内切酶酶切片段长度类型分析 (rDNA-RFLP)

参考 Zakrzewska-Czerwinska^[16]和 Liu^[17]的方法, 以及 Sambrook 等人^[18]和 Boehringer Mannheim, Biochemical^[19]叙述的有关方法。

2 结果

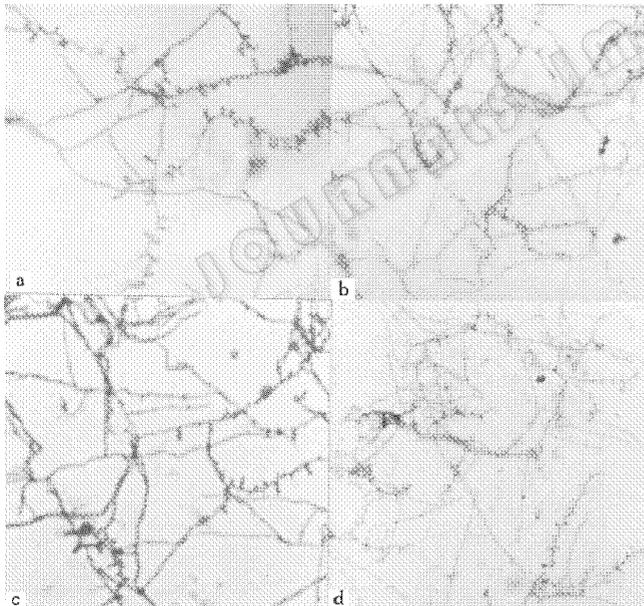


图 1 分离菌株的形态

- a. 菌株 19.1 的菌丝及孢子 ($\times 1\ 200$) b. 菌株 22.1 的菌丝及孢子 ($\times 900$) c. 菌株 202 的菌丝及孢子 ($\times 1\ 200$);
d. 菌株 212 的菌丝及孢子 ($\times 900$).

Fig. 1 Morphology of isolates

- a. mycelia and spora of strain 19.1 ($\times 1\ 200$) b. mycelia and spora of strain 22.1 ($\times 900$) c. mycelia and spora of strain 202 ($\times 1\ 200$);
d. mycelia and spora of strain 212 ($\times 900$)

2.1 形态学特征

4 株菌的形态特征均为基丝分枝, 不断裂。单个孢子密集着生于无分枝的孢子气丝枝周围 (图 1)。

2.2 培养特征

四株分离菌株在琼脂培养基、桑塔斯、葡萄糖、天门冬素和燕麦粉上的培养特征见表 1。

2.3 生理生化特征

四株分离菌株和参照菌株的生理生化特征列于表 2。

2.4 细胞化学及 G+C mol% 的测定

四株分离菌株的化学分类特征见表 3。

2.5 Ribotyping-rDNA 限制性内切酶酶切片段长度类型分析 (rDNA-RFLP)

四株分离菌株和相关菌株的 rDNA BamHI 酶切片段长度类型分析结果见图 2, 图 3 和表 4。树状谱由单连锁生成。

表 1 菌株 19.1、22.1、202 和 212 的培养特征

Table 1 Culture characteristics of strain 19.1 22.1 202 and 212

培养基	项目	19.1	22.1	202	212
桑塔斯	G:	良好	良好	良好	良好
	SM:	淡青黄	脂黄	无色	无色
	AM:	苍绿	纯灰	灰绿	深苍绿
	SP:	无	深绿	深绿	深绿
葡萄糖天门冬素	G:	不长	不长	不长	不长
燕麦	G:	中等	中等	不长	不长
	SM:	脂黄	脂白		
	AM:	榄灰	纯灰		
	SP:	无	无		

G:生长 SM:基丝 AM:气丝 SP:可溶性色素.

表 2 菌株 19.1、22.1、202 和 212 的生理生化特征

Table 2 Differentiating physiological characteristics of strain 19.1 22.1 202 and 212

实验项目	19.1	22.1	202	212	<i>S. viridis</i>	<i>S. caesia</i>	<i>S. azurea</i>	<i>S. cyanea</i>	<i>S. glauca</i>
最适生长温度 $^{\circ}\text{C}$	28	45	45	45	37-50	37	28	28	40
牛奶	胨化	+	-	+	+	n	+	+	n
	凝固	-	+	-	-	n	-	-	n
明胶	液化	+++	+++	+++	+++	+	+	+	n
纤维素	生长	-	-	-	-	n	n	n	n
硝酸盐	还原	-	-	+	+	-	n	n	n
黑色素	产生	-	-	-	-	n	-	-	n
淀粉	水解	+	-	+	-	n	n	n	n
NaCl 耐 受 度	1%	+	+	+++	+++	+	n	+	n
	2%	+	+	++	++	+	n	+	n
	3%	+	+	++	+	+	n	+	n
	4%	+	+	+	+	+	n	+	n
	5%	+	+	++	++	+	n	+	n
酸碱 耐 受 度	pH=5	-	-	-	-	n	n	n	n
	pH=8	+	+	+++	+++	+	n	n	n
	pH=9	+	+	+++	+	+	n	n	n
碳 源	对照	+	+	+	+	n	n	n	n
	葡萄糖	+++	+++	+++	+++	×	×	+	+
	蔗糖	++	++	+	+	+	×	+	×
利 用	木糖	+++ _A	+++ _A	+	+	×	×	+	×
	肌醇	+	-	+++	+++	n	n	-	n
用	鼠李糖	++	++	+	+	n	n	+	n
	甘露糖	+++ _A	++	+++	+	+	n	+	n
	半乳糖	+	+	-	-	+	n	-	n
果糖	阿拉伯糖	+	+	-	-	-	-	-	+
	果糖	++	++	+	+	-	×	+	×

+ ,生长 ; - ,不生长 ; A ,产酸 ; × ,有变化 ; n ,未知。标准菌株的数据来自相关文献^[20-24]。

表 3 菌株 19.1、22.1、202 和 212 的细胞化学类型及 DNA G + C mol% 值

Table 3 Cell wall type and DNA G + C mol% of strain 19.1 22.1 202 , 212

菌株	胞壁类型	糖类型	枝菌酸	磷酸类脂类型	醌类型	DNA G + C mol%
19.1	IV	A	-	PII	MK-9(H ₄)	77.6
22.1	IV	A	-	PII	MK-9(H ₄)	70.2
202	IV	A	-	PII	MK-9(H ₆)	73.3
212	IV	A	-	PIII	MK-9(H _{4,6})	74.3

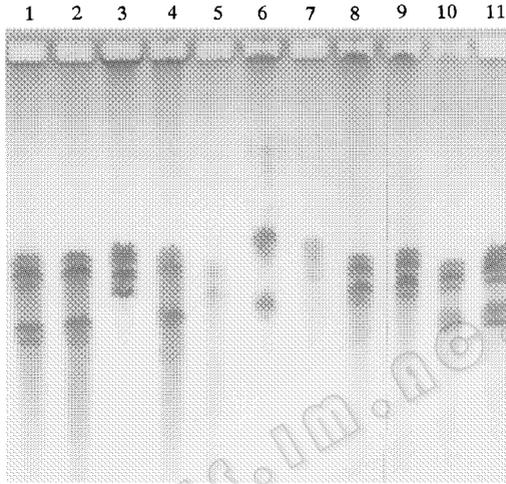


图 2 rDNA BamHI 酶解片段长度多态性图谱

1. 菌株 19.1 2. 菌株 22.1 3. 菌株 202 4. 菌株 212 5. 菌株 7551 6. 菌株 7552 7. 菌株 7444 ;
8. 菌株 3120 9. 菌株 3098 10. 菌株 3315 11. 菌株 3036. 探针为 DIG-11 \ | dUTP 标记的 P64.

Fig. 2 rDNA Ribotyping patterns of 4 isolated strains and 7 type strains of *Saccharomonospora* obtained by digestion genomic DNA with BamHI.

1. strain 19.1 2. strain 22.1 3. strain 202 4. strain 212 5. strain 7551 6. strain 7552 7. strain 7444 ;
8. strain 3120 9. strain 3098 10. strain 3315 11. strain 3036. Probe is DIG-11-DUTP labelled P64.

表 4 相似值(Ssm)表

Table 4 rDNA ribotyping similarity values of test strains

菌号	22.1	202	212	7551	7552	7444	3120	3098	3315	3036
19.1	0.75	0.22	0.75	0.00	0.40	0.50	0.22	0.22	1.00	0.91
22.1		0.57	1.00	0.00	0.50	0.33	0.29	0.29	0.75	0.67
202			0.29	0.69	0.22	0.57	1.00	1.00	0.22	0.40
212				0.00	0.50	0.33	0.29	0.29	0.75	0.67
7551					0.29	0.00	0.67	0.67	0.00	0.00
7552						0.25	0.44	0.44	0.40	0.36
7444							0.57	0.57	0.50	0.44
3120								1.00	0.22	0.40
3098									0.22	0.40
3315										0.91
Ssm										

相似值 0.0 0.2 0.3 0.4 0.5 0.6 0.7 0.8 0.9 1.0

!.....!.....!.....!.....!.....!.....!.....!.....!.....!

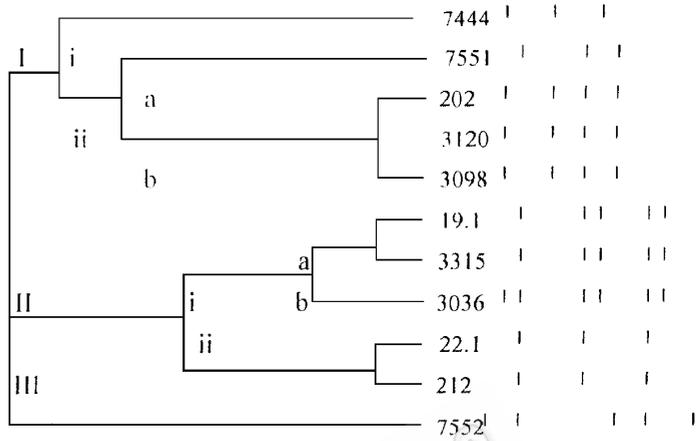


图3 rDNA Ribotypes 相似性图谱

Fig. 3 The dendrogram of rDNA ribotype clustering of test strains

3 讨论

3.1 Ribotyping 结果分析

11株菌在相似值0.5的水平上分为三个主群: I、II和III。群III为菌株7552(*S. cyanea*)。群I在相似值0.57的水平上分为两个亚群:i和ii,亚群i为菌株7551(*S. glauca*);亚群ii在相似值0.67的水平上再分为两个次亚群:a和b,次亚群a为菌株7444(*S. azurea*)菌株,次亚群b包括相似值为1的202(*S. sp.*)、3120和3098(*S. caesia*)。群II在相似值0.75的水平上分为两个亚群;i和ii,亚群i在相似值0.91的水平上再分为两个次亚群:a和b,次亚群a相似值为1的两个菌株:19.1(*S. sp.*)和3315(*S. viridis*),次亚群b为菌株3036(*S. viridis*);亚群ii为相似值为1的两个菌株:22.1(*S. sp.*)和212(*S. sp.*)。从图2可见,该属的5个已知种分处于5个不同的群中,群间的相似值分别为50%、57%和67%。

3.2 菌株的鉴定

菌株19.1、22.1、202和212均为好气菌,革兰氏阳性。葡萄糖天门冬素培养基不生长,桑塔斯培养基上生长良好,基丝形成扁平皮革状菌落,无色至淡青黄色,气丝极为丰富,纯灰色至深苍绿色。基丝分枝、不断裂,单个孢子密集生长于无分枝的气丝周围。胞壁IV型,糖型A,无枝菌酸,磷酸类脂II型(菌株2020为III型),主要醌类型为MK-9($H_4\beta$),G+C mol%介于70.2%~77.6%,与74%~75%的差异在种内差异范围内。这些形态特征和化学指征与糖单孢属一致^[19]。菌株19.1、22.1、202和212鉴定为糖单孢菌属。

Ribotyping 实验结果表明,19.1与JCM3315(*S. viridis*)具有100%的相似性,故

19.1 归属于青绿色糖单孢(*S. viridis*)。在桑塔斯培养基上,基丝淡青黄色,气丝极丰富,由白色变为苍绿色,不产生色素。孢子表面光滑。能液化明胶,不能还原硝酸盐,纤维素不生长,不产生黑色素,可耐受5%的盐浓度,pH5不生长;可利用蔗糖、甘露糖、半乳糖。这些特征均于青绿色糖单孢相同。

虽然菌株202的磷酸类脂类型不同于该属菌株具备的典型类型,但rDNA Ribotyping结果表明它与JCM3120和JCM3098(*S. caesia*)有100%的相似值,且具备糖单孢菌属的典型形态(图1e)。故202归属于青灰色糖单孢(*S. caesia*)。

22.1与212两株菌之间具100%的Ribotyping相似值,但不同于已知的任何一个种,与青绿色糖单孢*S. viridis*群亲缘关系最近,具有75%的相似值。22.1与212之间以及它们与青绿色糖单孢之间在培养特征、生理生化特征上均有相同和不同处(表1和表2);菌株212的醌类型与该属的典型类型略有不同(表3);它们与青绿色糖单孢之间的相似值又高于该属已知种之间的相似值。基于以上现象,无法确定这两株菌是定为青绿色糖单孢的亚种还是另定新种,这需要16S rRNA序列分析的结果来确定。

参 考 文 献

- [1] Nonomura H, Ohara Y. *J Ferment Technol*, 1971 **49**: 895~903.
- [2] Embley M, Smida J, Stackebrandt E. *Syst Appl Microbiol*, 1988 **11**: 16~19.
- [3] Nakase T. JCM Catalogue of Strains. 5th edition. Tokyo: Toppan Col. Ltd, 1992.
- [4] Shirling E B, Gottlieb D. *Int J Syst Bacteriol*, 1996 **16**(3): 317~327.
- [5] Lechevalier M P, Lechevalier H A. The Chemotaxonomic of Actinomycetes. In: Dietz A *et al.* A University Laboratory Approach Arlington: SIM Spec, Publ, No. 6, 1980: 277~284.
- [6] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975: 658.
- [7] Ridgway R. Color Standards and Color Nomenclature. Washington D C: Published by the Author, 1912.
- [8] Gordon R E, The Taxonomy of Soil Bacteria. In: Gray T R G, Parkinson D. The ecology of Soil Bacteria. Liverpool: Liverpool University Press, 1967: 293~321.
- [9] Gordon R E, Barnett D A, Handerman J B *et al.* *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and *Nocardin* Strains, *Int J Syst Bacteriol*, 1974 **24**(1): 54~63.
- [10] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. *J Gen Appl Microbiol*, 1983 **29**: 319~322.
- [11] Minnikin D E, Collins M D, Goodfellow M. *J Appl Bacteriol*, 1979 **47**: 81~95.
- [12] Minnikin D E, Hutchinson I G, Caldicott A B *et al.* *J Chromatography*, 1980 **188**: 221~233.
- [13] Collins M D. Isoprenoid Quinone Analyses in Classification and Identification. In: Goodfellow M *et al.* chemical Methods in Bacterial Systematics. London: Academic Press, 1985: 267~287.
- [14] 吴诚华, 陆小涛, 秦敏等. 微生物学通报, 1989 **16**(13): 176~178.
- [15] Marmur J, Doty P. 1962 *J Mol Biol*, **5**: 109~118.
- [16] Zakrzewska-Czerwinska J, Mordarski M, Goodfellow M. 1988, *J Gen Microbiol*, **134**: 2807~2813.
- [17] Liu Z H, Ruan J S, Zakrzewska-Czerwinska J *et al.* 1992, *Actinomycetes* **3**(3): 51~54.
- [18] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [19] Boehringer Mannheim. DIG System User's Guide for Filter Hybridization, 1992.
- [20] Goodfellow M, Lechevalier M P, Prauser H. Group 22 Nocardioform Actinomycetes. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th ed.). Maryland: Williams & Wilkins, 1989: 629~630.
- [21] Greiner-Mai E, Korn-Wendisch F, Kutzner H J. *Int J Syst Bacteriol* 1988, **38**: 398~405.

[22] Hu R M. *Int J Syst Bacteriol* , 1987 , 37 : 60~61.

[23] Hu R M , Cheng L , Wei G. *Int J Syst Bacteriol* , 1988 , 38 : 444~446.

[24] Kurup V P. *Microbiologica* , 1981 4 : 249~259.

TAXONOMIC STUDY OF FOUR ISOLATES OF *SACCHAROMONOSPORA*

Qi Weihong Liu Zhiheng

(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080*)

Abstract Four strains , 19.1 , 22.1 , 202 , and 212 , were isolated from the soil samples of Guangxi province in China. Basing on their morphological and cell chemical characteristics (cell wall type IV , sugar type A , without mycolic acids) , they were circled into the genus of *Saccharomonospora* . They were studied with 7 type strains of the 5 currently recognized species in the genus. The results of Ribotyping suggest that strain 19.1 belongs to the species of *S. viridis* , strain 202 is a member of *S. caesia* , strain 22.1 and strain 212 are the same species , which is different to the 5 currently known species. It is closely related to *S. viridis* . However , the further classification of these two strains at species level needs 16S rRNA sequence data.

Key words *Saccharomonospora* , Morphology of strain , Culture characteristic