

诺卡氏菌型放线菌细胞中脂肪酸的气相色谱分析

张建丽^{1*} 张娟¹ 宋飞¹ 张军¹ 范蕾¹ 刘志恒²

(1. 北京理工大学生命科学与技术学院 北京 100081)

(2. 中国科学院微生物研究所微生物资源国家重点实验室 北京 100101)

摘要: 采用 Sherlock 全自动微生物鉴定系统, 用气相色谱法, 分析测定了 4 株诺卡氏菌型放线菌分离菌株的脂肪酸成分和含量, 结果表明, 该法具有分辨率高, 稳定、重现性好, 简便易行等特点, 在一定程度上与 16S rRNA 基因序列比较结果相一致, 能在种及菌株水平上反映出放线菌的基因型、系统发育和分类关系, 是一种较好的脂肪酸定量测定方法, 尤其适用于分析大量的菌株或分离株, 可应用于放线菌种水平的分类和快速鉴定。

关键词: 脂肪酸分析, 诺卡氏菌型放线菌, 气相色谱, 快速鉴定

Gas Chromatographic Analysis of Cellular Fatty Acid Patterns of Nocardioform Actinomycetes

ZHANG Jian-Li^{1*} ZHANG Juan¹ SONG Fei¹ ZHANG Jun¹ FAN Lei¹ LIU Zhi-Heng²

(1. School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

(2. State Key Laboratory of Microbial Resource, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: The cellular fatty acid patterns in 4 isolates of nocardioform actinomycetes were analyzed quantitatively by gas chromatography using the Sherlock standard MIDI (Microbial Identification) system. The results indicate that the method is relatively unique, simple, stable, and reproducible. To some extent, it yields results that are in agreement with 16S rRNA gene sequences study, and appears to reflect the genotypic, phylogenetic and taxonomic relationships of actinomycetes at the species-strain level. Therefore, it can be used as a rapid and efficient means of determining taxonomic diversity and phylogenetic structure of actinomycetes at the species level, especially of large collections of strains.

Keywords: Fatty acid analysis, Nocardioform actinomycetes, Gas chromatography, Rapid identification

脂肪酸是放线菌细胞中脂类和脂多糖的主要组分, 已经鉴定出脂肪酸有 300 多种不同的化学结构, 脂肪酸的链长、双键位置和数量及取代基团具有分类学意义, 是一项重要的分类特征。脂肪酸分析具有快速、方便, 自动化程度高等优点, 适用于大量菌株的快速分析。脂肪酸组分一般较为复杂, 分别归

属 3 种类型: 直链饱和与不饱和、分枝和复杂形式的脂肪酸。脂肪酸分析应在标准化的条件下进行, 因为不同组分的相对含量因菌龄和培养条件的不同而异。在高度标准化的培养条件下, 细胞的脂肪酸甲基酯(Fatty acid methyl esters, FAMES)组分是一较稳定的分类学特征^[1-3]。脂肪酸定性分析结果限于属

和属以上的分类; 脂肪酸定量分析结果可为种和亚种分类提供有用的基本资料。脂肪酸的组分测定可以使用玻璃毛细管柱(glass capillary column)气相色谱, 或气-质联用色谱(Gas-mass spectrometer)。本文报告采用美国MIDI(Microbial Identification)公司Sherolock全自动微生物鉴定系统对4株诺卡氏菌型放线菌分离菌株脂肪酸成分的标准化分析结果, 并探讨了这一方法在放线菌分类鉴定中的作用和意义。

1 材料和方法

1.1 实验菌株来源

选择4个诺卡氏菌型放线菌分离菌株作为实验菌株, 其中菌株276分离自北京西山土样; 菌株F829分离自安徽省采石矾土样; 菌株M712和菌株B3分离自安徽省马鞍山土样。

1.2 仪器与试剂

HP6890型气相色谱仪(美国惠普公司): 配备分流/不分流进样口, 氢火焰离子化检测器(FID)及HP气相色谱化学工作站(HP CHEMSTATION ver A 5.01); 色谱柱为Ultra-2柱, 长25 m, 内径0.2 mm, 液膜厚度0.33 μm 。所有试剂均为分析纯, 购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.3 形态和培养特征观察

在TSB培养基^[4]上28℃插片培养, 不同时间取片, 用光学显微镜和Hitachi S-570型电子显微镜观察形态。培养4 d~14 d, 记录培养特征。

1.4 菌体脂肪酸提取方法

1) 试剂的配制

溶液: 45 g 氢氧化钠溶于150 mL 甲醇及150 mL 蒸馏水

溶液: 190 mL 浓盐酸, 275 mL 甲醇溶于135 mL 蒸馏水

溶液: 200 mL 正己烷与200 mL 乙醚混合均匀

溶液: 10.8 g 氢氧化钠溶于900 mL 蒸馏水

溶液: 饱和氯化钠溶液

2) 实验菌株在TSB琼脂培养基上28℃培养^[5], 用接种环刮取适量培养物, 置于8 mL螺口玻璃管中, 加入1 mL溶液, 拧紧螺盖, 沸水浴5 min, 取出振荡5 s~10 s, 继续沸水浴25 min。

3) 待样品管冷却后, 加入2 mL 溶液, 盖严振荡, 随后精确控制 80 ± 1 ℃水浴10 min, 冰浴冷却。

4) 样品管中加入1.25 mL 溶液, 快速振荡10 min左右, 弃去下层水相。

5) 在剩余有机相中加入3 mL 溶液及几滴溶液, 快速振荡5 min左右, 取2/3上层有机相置气相色谱样品瓶中备用。

1.5 菌体脂肪酸的气相色谱分析

炉温为二阶程序升温: 起始温度170℃, 以5℃/min升至260℃, 随后以40℃/min升至310℃, 维持1.5 min; 进样口温度250℃, 载气为氢气, 流速0.5 mL/min, 分流进样模式, 分流比100:1, 进样量2 μL ; 检测器温度300℃, 氢气流速30 mL/min, 空气流速216 mL/min, 补充气(氮气)流速30 mL/min。

1.6 构建16S rDNA系统进化树

从GenBank数据库中获得诺卡氏菌属(*Nocardia*)和红球菌属(*Rhodococcus*)的16S rRNA基因序列, 构建系统进化树。序列对排用CLUSTAL_X 1.8 program^[6], 进化树的构建按照Neighbour-joining方法, 用PHYLP program中的NEIGHBOUR program进行^[7-9]。

2 结果与分析

2.1 放线菌分离菌株分类地位的初步确定

主要依据形态和培养特征, 经过肉眼观察和光学、电子显微镜观察, 确定4株分离菌株系诺卡氏菌型放线菌。发现菌株276和菌株F829菌体有横隔断裂, 初步确定属于诺卡氏菌属; 菌株M712和菌株B3呈现初级分枝菌丝体, 24 h~48 h后菌丝体断裂成新的球状或杆状非活动小体, 无气生菌丝, 初步确定属于红球菌属。

2.2 诺卡氏菌型放线菌分离菌株脂肪酸成分分析

对4株诺卡氏菌型放线菌分离菌株进行脂肪酸成分的气相色谱分析(表1和表2)。脂肪酸主要有直链饱和、不饱和及10-甲基分枝脂肪酸。

表1表明诺卡氏菌属不同种的脂肪酸含量存在差异, 但多数种的菌体脂肪酸主要成分是C_{16:0}、C_{18:0}、C_{18:1 cis9}和10-methyl-C_{18:0}。菌株276、菌株F829的脂肪酸图谱不同于该属其他有效发表的种^[10], 推断可能是诺卡氏菌属的2个新种。表2表

表 1 菌株 276、菌株 F829 和诺卡氏菌属相关种的菌体脂肪酸成分(%)
Table 1 Cellular fatty acid profiles of strain 276, strain F829 and related *Nocardia* species

脂肪酸(%) Fatty acids	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
饱和 Saturated acids																
C _{14:0}	0.9	2.0	1.2	1.1	1.4	0.9	1.6	0.5	0.9	1.2	0.7	1.8	0.5	2	1.4	
C _{15:0}	0.3			2.0	1.2	0.2		0.3		4.1	0.4	0.5	0.4	1.2		
C _{16:0}	42.3	26.0	28.1	37.9	40.0	0.4	37.7	20.8	36.9	28.0	44.5	39.7	44.1	37.4	33.1	21.8
C _{17:0}	0.4	1.2	0.7	2.8	1.0	0.8	0.6	1.4	1.2	3.0	0.3	0.7	0.4	1.1		5.9
C _{18:0}	8.9	22.6	7.5	6.5	7.9	11.8	13.6	38.3	10.0	3.5	4.3	4.6	0.9	1.0	7.6	31.7
C _{20:0}						9.0	0.6	7.8								
不饱和 Unsaturated acids																
C _{16:1 cis9}	3.4	6.9		0.2	0.3	1.6	0.2	3.2	9.7	17.2	0.3	0.9	8.0	13.8		
C _{16:1 trans}						32.2									12.0	10.7
C _{17:1 cis9}			0.7	1.4			1.3									1.3
C _{18:1 cis9}	7.4	19.1	32.5	18.6	24	2.8	24.8	6.3	24.7	13.0	15.0	22.9	16.7	25.8	32.7	16.1
10-甲基 10-Methyl acids																
C _{16:0}	0.8															
C _{17:0}							0.3			2.5		0.3				
C _{18:0}	28.2	18.7	12.5	9.9	12.9	35.9	10.8	15.9	16.6	20.3	20.3	15.4	25.2	15.3	11.3	7.8

Note: Strains are identified as: 1: *N. abscessus* DSM 44432^T; 2: *N. africana* DSM 44491^T; 3: *N. asteroides* ATCC 19247^T; 4: *N. beijingensis* JCM 10666^T; 5: *N. brasiliensis* ATCC 19296^T; 6: *N. cyriacigeorgici* DSM 44484^T; 7: *N. farcinica* ATCC 3318^T; 8: *N. ignorata* DSM 44496^T; 9: *N. nova* JCM 6044^T; 10: *N. pseudovaccinii* DSM 43406^T; 11: *N. tenerifensis* DSM 44704^T; 12: *N. transvalensis* DSM 43405^T; 13: *N. vac-cinii* DSM 43285^T; 14: *N. veterana* DSM 44445^T; 15: Strain 276; 16: Strain F829

表 2 菌株 M712、菌株 B3 和红球菌属相关种的菌体脂肪酸成分(%)
Table 2 Cellular fatty acid profiles of strain M712, strain B3 and related *Rhodococcus* species

脂肪酸(%) Fatty acids	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
饱和 Saturated acids																
C _{14:0}	1.8	2.9	7.3	4.6	2.3	2.8	2.0	3.0	3.4	1.8	3.1	1.7	1.5	1.7	4.5	4.0
C _{15:0}	2.7	1.3	5.0	5.2	1.6	11.6	23.0	15.6	10.7	1.0	3.3	1.9	2.9	1.0	5.6	6.0
C _{16:0}	23.1	26.1	22.0	26.4	27.4	28.4	7.0	24.6	28.6	34.0	34.3	22.7	27.4	32.7	29.7	29.3
C _{17:0}	1.8	17.3		1.7	2.7	11.4	20.0	7.5	6.6	3.0	1.4	2.8	4.3		4.1	4.8
C _{18:0}		2.4		1.4	4.0	2.7	1.0	1.3	1.9	5.2	1.0	1.9	2.4	8.8		
C _{19:0}		3.4	10.9		13.0	0.5				2.4		2.7		0.6		
C _{20:0}			5.1		2.6					1.2		5.2		2.1		
不饱和 Unsaturated acids																
C _{16:1 cis9}	5.6	1.5	2.8	0.9		7.0	3.0	6.9	9.0	5.8		4.1	1.2	6.6		
C _{17:1 cis9}	1.3		3.0	3.1	1.0	16.7	22.0	17.8	14.2	1.6	2.3	1.6	4.3	1.2	5.3	5.0
C _{18:1 cis9}	2.4	3.2	9.7	26.2	15.5	10.6	7.0	9.5	11.3	21.6	13.7	6.0	20.7	16.5	10.9	11.3
10-甲基 10-Methyl acids																
C _{16:0}	12.5	2.7	2.1					0.5	0.7	1.4		5.2	0.6	2.9		
C _{17:0}	4.5	1.6	2.4	1.3	0.9	1.5	2.0	2.8	2.3	0.7	2.1	2.2	1.8		3.3	2.9
C _{18:0}	24.1	18.2	11.0	11.5	14.3	1.3	1.0	1.8	2.4	11.5	23.7	22.8	15.6	13.1	16.7	17.2

Note: Strains are identified as: 1: *R. coprophilus* DSM 43347^T; 2: *R. equi* DSM 20307^T; 3: *R. erythropolis* DSM 43066^T; 4: *R. fascians* DSM 20669^T; 5: *R. globerulus* DSM 43954^T; 6: *R. koreensis* JCM 10743^T; 7: *R. marinonascens* DSM 43752^T; 8: *R. opacus* DSM 43205^T; 9: *R. percolatus* HAMBI 1752^T; 10: *R. pyridinovorans* KCCM 80005^T; 11: *R. rhodnii* DSM 43336^T; 12: *R. rhodochrous* DSM 43241^T; 13: *R. ruber* DSM 43338^T; 14: *R. zopfii* ATCC 51349^T; 15: Strain M712; 16: Strain B3

明红球菌属不同种的脂肪酸含量也存在差异,与诺卡氏菌属相比,红球菌属中多数种的菌体脂肪酸主要成分是 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:1}$ *cis*9 和 10-methyl- $C_{18:0}$,有些种含有较高比例的 $C_{15:0}$ 、 $C_{17:0}$ 和 $C_{17:1}$ *cis*9,而 $C_{18:0}$ 的含量较低。菌株M712的脂肪酸图谱不同于该属其他有效发表的种^[11],菌株B3与菌株M712的脂肪酸成分和含量相近,这一结果表明菌株M712和菌株B3属于同一个种,可能是红球菌属的新种。

2.3 脂肪酸分析结果与 16S rDNA 系统进化树的比较

基于 16S rRNA 基因全序列构建的 16 个诺卡氏菌和 16 个红球菌相互关系的系统进化树见图 1。诺

卡氏菌属和红球菌属分别形成两大聚类群,菌株 276、菌株 F829 位于诺卡氏菌属聚类群中,菌株 276 形成单独的分枝,菌株 F829 与处于同一进化枝的 *N. pseudovaccinii* 距离较远,说明菌株 276 和菌株 F829 属于该属的 2 个新种;菌株 M712 与菌株 B3 聚在一个分枝上,亲缘关系相近,同属于一个种,共处于红球菌属的辐射分枝范围内。脂肪酸分析结果与 16S rRNA 系统进化树所显示的菌株间关系相吻合。

以 16S rRNA 为基础的系统发育分析、表型分析、以及 DNA-DNA 杂交实验也证实菌株 276、菌株 F829 是诺卡氏菌属中的 2 个新种,菌株 M712 是红球菌属的 1 个新种,现已生效发表^[4,12,13]。

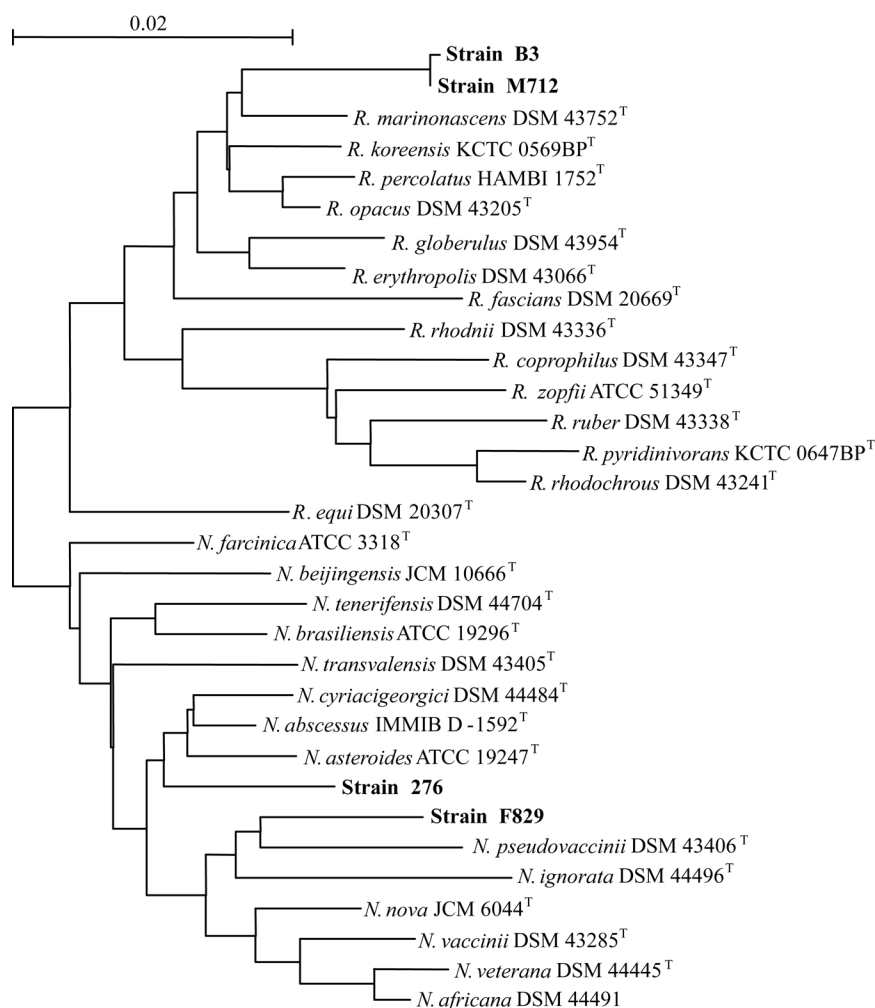


图 1 诺卡氏菌属和红球菌属相互关系的 16S rDNA 系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence showing the relationships between the genus *Nocardia* and *Rhodococcus*

Note: The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position

3 讨论

在放线菌多相分类方法中, DNA同源性分析是建立新种的重要标准^[14], 但对大量菌株进行DNA-DNA杂交显然是不切实际的。随着核酸测序技术的发展, 16S rRNA基因序列越来越多地被用于放线菌的系统进化研究, 但16S rRNA基因测序较慢且成本较高, 所以, 建立快速方便、又较准确的分类方法和系统显得十分必要。由于16S rRNA基因只是放线菌DNA信息中的一小部分, 它们反映的菌株间的关系可能会有偏差; 且保守性很强, 有时不能提供足够的分辨率区分亲缘关系较近的种或相关属, 在这种情况下就必须运用其他多种分类方法和手段来确定菌株的分类地位。

脂肪酸定量分析结果可为放线菌种和亚种分类提供有用的基本资料。该法能在种及菌株水平上反映出放线菌的基因型、系统发育和分类关系, 且在一定程度上与16S rRNA基因序列比较结果相一致, 采用Sherolock全自动细菌鉴定系统, 用气相色谱法测定放线菌细胞中的脂肪酸, 具有操作简便、快速、灵敏度高、准确度高、重复性好等特点, 尤其为解决具有相似形态特征的诺卡氏菌型放线菌的分类问题, 提供了明确的化学指标。因此可作为一种快速鉴定方法, 适用于分析大量的菌株或分离株, 通过与数据库中的菌体脂肪酸图谱相比较, 采用MIDI(Microbial Identification System)软件分析系统, 进行聚类分析, 将为进一步的分类鉴定提供明确的方向和理论指导。也应当指出, 与16S rRNA基因数据库相比, 脂肪酸数据库更新速度太慢, 急待完善。采用此方法快速鉴别时应在培养条件和实验方法标准化的条件下进行脂肪酸定量分析。

参 考 文 献

[1] 张学武, 张建丽. 小单孢菌属的分类及应用研究. 微生

物学通报, 2006, 33(5): 117-121.

- [2] O'Donnell AG. Computer-assisted Bacterial Systematics. London: Academic Press, 1985, pp.403-414.
- [3] Saddler GS, Goodfellow M, Minnikin DE. Influence of the growth cycle on the fatty acid and menaquinone composition of *Streptomyces cyaneus* NCIB 9616. *J Appl Bacteriol*, 1986, 60: 51-56.
- [4] Zhang J, Zhang Y, Xiao C, et al. *Rhodococcus maanshanensis* sp. nov., a novel actinomycete from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, 52(6): 2121-2126.
- [5] Kämpfer P, Kroppenstedt RM. Numerical analysis of fatty acid patterns of coryneform bacteria and related taxa. *Can J Microbiol*, 1996, 42, 989-1005.
- [6] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876-4882.
- [7] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406-425.
- [8] Li B, Furihata K, Ding L, et al. *Rhodococcus kyotonensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, 57(9): 1956-1959.
- [9] Felsenstein J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package. version 3.6. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, USA, 1993.
- [10] Kämpfer P, Buczolits S, Jckel U, et al. *Nocardia tenebrifensis* sp. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54: 381-383.
- [11] Yoon JH, Kang SS, Cho YG, et al. *Rhodococcus pyridinivorans* sp. nov., a pyridine-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50: 2173-2180.
- [12] Zhang J, Liu Z, Goodfellow M. *Nocardia caishijiensis* sp. nov., a novel soil actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(4): 999-1004.
- [13] Zhang J, Liu Z, Goodfellow M. *Nocardia xishanensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(6): 2301-2305.
- [14] Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, 1987, 37: 463-464.