

几株红假单胞菌属细菌的表观特征及其遗传多样性研究*

张德民 黄志勇 杨惠芳

曹文伟 段俊欣

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(辽宁师范大学生物系 大连 116029)

摘 要 采用变性梯度胶电泳(DGGE)分析方法和传统的表型特征研究方法、化学方法、核酸杂交方法等技术对 14 株紫色非硫细菌进行了多相研究。它们均具有红假单胞菌属(*Rhodospseudomonas*)的基本特征:具片层状光合内膜结构,出芽分裂,含细菌叶绿素 α 和正常的螺菌黄素等。根据形态大小、黑暗条件下能否形成好氧菌落及碳源利用上的差异可将 14 株菌分为 T 群和 g-c 群两群。用一对引物 341f~906r 扩增 3 株标准菌株 *Rps. palustris* ATCC 17001、*Rps. rubra* R1、*Rps. julia* ATCC 51105 和 14 株分离株的 16S rRNA 基因片断,作 DGGE 分析,结果发现,17 株菌中有 5 个遗传型:g-c 型、R1 型、T 型、pal 型、jul 型。3 个标准菌株分别是 R1 型、pal 型、jul 型,而 14 株分离菌株除包括 R1 型外,另有 2 个新的遗传型:T 型和 g-c 型。几个代表菌株的总 DNA 的杂交结果表明,T 型和 g-c 型可能代表 2 个新的种群。

关键词 紫色非硫细菌,红假单胞菌属,变性梯度胶电泳(DGGE),遗传多样性

中图分类号:Q939.11 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2000)03-0229-36

光合细菌是一群重要的细菌,有关光合细菌的应用在我国也受到很大重视。对我国光合细菌资源及分类的研究也有一些报道,但多停留在表型特征的描述上,DNA 的研究仅局限在 GC 含量测定及总 DNA 杂交上^[1]。我们曾对本实验室分离的一株光合菌的 16S rRNA 基因进行了序列测定及分子系统学分析^[2],发现 16S rRNA 基因具有很强的保守性,其基因序列不受环境或培养条件的影响,序列差异在相当程度上反映了物种的遗传多样性及其亲缘关系。但是 16S rRNA 基因序列测定成本很高,如果用一种廉价、有效的方法先对所有菌株的遗传多样性进行初步筛选,之后,只需将遗传型不同的 16S rRNA 基因测序即可,这样就会避免或减少由于重复测序而造成的人力财力大量浪费。

Myuzer^[3]将变性梯度胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)技术应用到微生物分子生态学,以确定自然环境中微生物群体的遗传多样性。其原理是使用一对特异性引物 PCR 扩增微生物自然群体的 16S rRNA 基因,产生长度相同但序列有异的 DNA 片段的混合物,然后用 DGGE 分离产物混合物。DGGE 胶是在 6% 聚丙烯酰胺胶中添加线性梯度的变性剂,变性剂的浓度由上到下,从低到高成线性梯度。在一定温度下,在同一浓度的变性剂浓度下,序列不同的产物,其部分解链程度也不同,而产物解链程度又直接影响其电泳迁移率,结果不同的产物在凝胶上分离开来。在引物的 3' 端加上 40 个

* 国家自然科学基金资助项目(29577291)

作者简介 张德民(1964-),男,河南人,辽宁师范大学生物系,博士,1999 年赴日本读博士后,主要从事环境微生物学研究

收稿日期:1998-12-04,修回日期:1999-04-07

碱基左右的 G-C 串可使 DGGE 对序列差异的分辨率提高到近 100%。所以 DGGE 方法可用于揭示微生物群体的多样性。分离开的各条带可切下再扩增,直接测序,作系统学分析。后来又有人^[4-6]将 DGGE 方法扩大到分析富集微生物和微生物菌株的筛选上,从而避免了对多个无遗传差别或差别很小的菌株重复进行繁琐的各种表观特征研究,大大降低了工作量。国内尚无这方面的报道。

在对本实验室分离的光合菌表型特征初步研究的基础上,使用国产电泳设备对表型特征相似的 14 株分离菌及 3 株相关标准菌的 16S rRNA 基因进行了遗传多样性筛选,选出遗传上有差异的代表性菌株进一步作了醌类成分、GC 含量及总 DNA 杂交研究。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

标准菌株沼泽红假单胞菌(*Rhodospseudomonas palustris* ATCC 17001), 血色红假单胞菌(*Rhodospseudomonas rubra* R1), *Rhodospseudomonas julia* ATCC 51105 由德国 J F Imhoff 教授赠送。其他菌株由本实验室分离(表 1)。

1.2 培养基成分

AT 培养基参照文献^[7],但不加碳酸氢钠;ATYP 培养基:AT 添加酵母提取物(0.05%) 和蛋白胨(0.03%);厌氧光照培养条件为 33°C~38°C,1000~2000Lux。

1.3 形态结构观察及生理生化试验

光镜与电镜结合观察个体形态、鞭毛及光合内膜结构。活细胞吸收光谱测定参考 Hiraish^[8],用 HEWLETT PACKARD 1074 和 HITACHI 色谱仪分别测定 300~

820nm 和 800~1200nm 的吸收光谱。生长因子、碳源、氮源及电子供体利用试验参考 Hiraish^[8],所用培养基为 AT 培养基,其他实验则用 ATYP 培养基。

1.4 DNA 提取、G+C mol%测定及 DNA 杂交

DNA 提取参照 Marmu^[9]林万明^[10]方法,并加以改进:菌株培养至对数生长期后期,5000r/min 离心收集菌体,用溶菌酶裂解液(蔗糖 0.3mol/L,Tris-HCl 125mmol/L,EDTA 25mmol/L)洗涤细胞,液氮研磨三次,重悬于溶菌酶裂解液,加溶菌酶(2mg/mL)37°C 处理 1h,SDS(终浓度为 2%)60°C 处理 2h 以上,酚/氯仿/异戊醇抽提,氯仿抽提两次,乙醇沉淀,搅出 DNA 丝,溶于 0.1×SSC,加入 RNA 酶(100μg/mL)37°C 处理 1h,酚/氯仿/异戊醇抽提,氯仿抽提两次,异丙醇沉淀,搅出 DNA 丝,溶于 0.1×SSC。

G+C mol% 测定采用热变性法^[10,11]。DNA 杂交采用固相膜法^[11]。

1.5 16S rRNA 基因片断的 PCR 扩增

两个 PCR 引物 341(5'-CGCCCCGGCGCCCCGGCGCGCCGCGCCG

表 1 供试菌株来源

Table 1 The sample of the tested strains

Strains	Sample source
g-c	Chick faeces
gf	Chick faeces
HB	Chick faeces
rA	Chick faeces
S	Chick faeces
V2	Chick faeces
P	Photosynthetic bacteria agents
981	Photosynthetic bacteria agents
3-0	Wastewater treatment plant
982	Wastewater treatment plant
III B	Wastewater treatment plant
H3C	Printing and dyeing mill
T	Yuan Ming Yuan park
YNS	Hot spring in Yun Nan province
<i>Rps. rubra</i>	Professor J F Imhoff Germany
<i>Rps. julia</i>	Professor J F Imhoff Germany
<i>Rps. palustris</i>	Professor J F Imhoff Germany

CCCCGCCCCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 907r(5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3')分别对应于 *E. coli* 16S rRNA 基因的第 341~357 个碱基和第 907~928 个碱基,在 341f 的 5' 端连有一个由 40 个碱基组成的 GC 串。扩增片断大小为 625bp 左右。PCR 试剂盒购自 promega 公司,按其说明书操作。反应条件:94℃ 预变性 4min,循环参数为 94℃ 变性 1min,72℃ 延伸 3min,复性 1min,复性温度第一个循环是 65℃,以后每个循环降低 1℃,至第 10 个循环降至 56℃,然后维持 55℃ 的复性温度 20 个循环。

1.6 变性梯度胶电泳(DGGE)

用 341f 和 907r 扩增的 PCR 产物作 DGGE 分析。DGGE 胶浓度为 6%(wt/vd),用 1×TAE 配制(40mmol/L Tris-Acetate pH7.4,10mmol/L Acetate,0.5mmol/L Na₂EDTA)。变性剂梯度为 40%~80%(100% 变性剂相当于 7mol/L 尿素及 40% 甲酰胺,甲酰胺预先用树脂处理)。加样量为 20μL。电泳条件:60℃,80V,12h。电泳完毕后,EB 染色 30min,UV 透射成像系统照相。

1.7 醌类测定

根据阮继生等方法^[12],菌体冷冻干燥,氯仿-甲醇(2:10)抽提(以正己烷-乙醚(85:15)为展层剂,用 GF252 硅胶板薄层层析分离,在 252nm 的紫外灯下,将呈蓝色的条带刮下,溶于氯仿中,用 HEWLETT PACKARD 1074 高压液相色谱(HPLC)分析泛醌和单甲基萘醌,流动相为乙腈-丙二醇(75:25);用 Q10 试剂和标准菌株 *Rps. rutila* R1 作标准。

2 结果

2.1 形态结构特征(表 2)

14 株菌的共同特征为:光照厌氧液体培养物颜色为红色,出芽分裂,不对称生长,含细菌叶绿素 a 和正常的螺菌黄素,老液体培养物形成玫瑰花结构,无荚膜,均是极生鞭毛,具片层状光合内膜结构。这些均符合 *Rhodospseudomonas* 属的基本特征,结果见表 2。

根据这些菌株的培养特征及形态生理特征可将其分为 2 个类群:

表 2 两群分离株的培养特征及形态结构特征

Table 2 Cultural and morphological characteristics of the two groups of isolates

Characteristics	T group	g-c group
厌氧液体培养物颜色	红色	红色
厌氧菌落颜色	紫色	紫色
好氧菌落颜色	浅红色	
黑暗好氧生长	生长	不长
个体形态及排列	杆状	弧状或杆状
菌体大小/μm	0.6~0.8×1.0~3.5	0.5~0.8×0.9~2.0
最适生长温度/℃	33~38	34~41
菌体表面	光滑	不光滑
鞭毛	极生	极生
出芽分裂	有柄	无柄
细胞内膜	片层状	片层状
光吸收峰/nm	376~380 460~468 494~498 526~534, 586~594 806~808 855~869	382 460~464 494~496 538~534, 596 804~806 870~874
光合色素	叶绿素 a 和螺菌黄素	叶绿素 a 和螺菌黄素
生长因子	对氨基苯甲酸	硫胺素

一是 T 群。以菌株 T 为代表,包括 T, YNA, HB, 3-0, H3C, 981, 982, P 共 8 株。细胞

形态为杆状 稍有弯曲 $0.5\sim 0.8\mu\text{m}\times 1.0\sim 3.5\mu\text{m}$ 。这些菌株除了能光照厌氧生长外,还能在黑暗条件下好氧平板上生长。黑暗好氧平板上的菌落先是无色,后变为浅红色。细胞分裂为出芽分裂,有分裂管,两个子细胞呈哑铃形。最适生长温度为 $33^{\circ}\text{C}\sim 38^{\circ}\text{C}$ 。需对氨基苯甲酸作生长因子。

二是 g-c 群。以 g-c 为代表,包括 g-c、gf、HB、rA、S、V2 等 6 株。细胞形态多变,有杆形、肾形和弧形,以弧形最多 $0.6\sim 0.8\mu\text{m}\times 0.9\sim 2.0\mu\text{m}$ 。菌体表面不光滑,似有粘液物质产生。只能厌氧或微好氧条件下生长,黑暗好氧条件下不能形成单菌落。细胞分裂为出芽分裂,无分裂管,子细胞与母细胞连在一起的形状象 S 形。最适生长温度为 $35^{\circ}\text{C}\sim 41^{\circ}\text{C}$ 。需硫酸素作生长因子。

2.2 生理生化特征

两群菌株的碳源利用情况如表 3。均可利用的碳源有乙酸盐、丁酸盐、延胡索酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、丙酸盐、丙酮酸盐、琥珀酸盐,均不利用的碳源有酒石酸盐、山梨醇、甲

表 3 14 个菌株的碳源及电子供体

Table 3 Carbon sources and electron donors of 14 strains

Compounds	T-group								g-c-group					
	YNS	T	981	982	3-0	III B	P	H3C	g-c	gf	V2	rA	HB	S
Acetate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asparate		+				+	+							
Benzonate	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Butyrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA	+	+	-	+	(-)	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Formate	-	+	-	-	+	-	+	(-)	+	-	-	-	-	-
Fructose	-	+	+	(-)	-	+	(-)	-	+	-	-	+	-	-
Fumarate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-	+	(-)	-	+	(-)	+	-	-	-	-
Glutamate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	(-)	+	-	-	-
Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Lactate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	+	(-)	-	-	-	-	+	(-)	-	-	-	-
Mannose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Methonal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propionate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	(-)	+	+	+	+	+	(-)	+	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Succinate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	-	-	-	-	-	-	+	(-)	+	(-)	+	-	-
Tartrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	(-)	+	+	-	-	-
3% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

醇、甘露醇、谷氨酸、柠檬酸盐、精氨酸,部分菌株能利用的有天冬氨酸、酪蛋白水解物、甲酸盐、果糖、葡萄糖、蔗糖。二者在碳源利用上的差别:T群均可利用乙醇、葡萄糖酸盐、丙三醇、鼠李糖、木糖作碳源,除1株外,均可利用苯甲酸。而g-c群则不能利用苯甲酸、乙醇、葡萄糖酸盐、丙三醇、鼠李糖、木糖作碳源。

所有菌株在碳酸氢钠作碳源时,均能利用氢气作电子供体,但不能利用硫化物、硫代硫酸盐作电子供体进行光自养生长。氨及氮气均可作为氮源。最适pH值范围为6.0~8.0。均不能利用DMSO或硝酸盐作电子供体进行黑暗厌氧生长。

2.3 变性梯度胶电泳

用引物341f和907r扩增14株分离菌及3株标准菌的16S rRNA基因,得到的片段大小约为620bp左右,然后用40%~70%的DGGE胶上分别于60°C(图1A)和55°C(图1B)温度下分析。结果共出现5个不同的带型,3个标准菌株代表3个各不相同的带型:

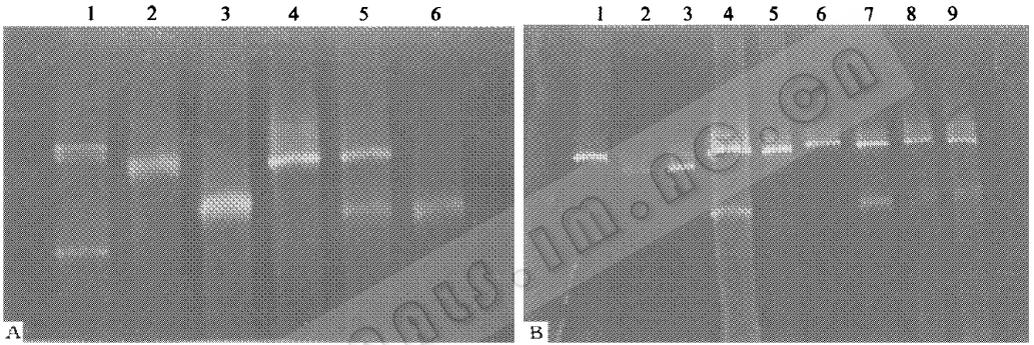


图1 *Rhodospseudomonas* 属 10 个菌株的 16S rDNA 扩增片段的 DGGE(40%~70%)分析

Fig.1 DGGE(40%~70%) analysis on the PCR-amplified fragments of 10 strains which belonging to *Rhodospseudomonas* Electrophoresis temperature ;A. 60°C ;B. 55°C .

(A) 1. g-c ; 2. 17001 ; 3. R1 ; 4. T ; 5. YNS ; 6. 51105.

(B) 1. 3-0 ; 2. T ; 3. YNS ; 4. g-c ; 5. R1 ; 6. 17001 ; 7. V2 ; 8. HB ; 9. rA.

R1型、pal型、jul型,14个分离株中,也出现了3个带型,其中有1个带型与标准株 *Rps. rutila* R1的带型一致,另2个带型则g-c型和T型是新带型。具体情况如下(1)g-c型(图1-A中g-c带,图1-B中的g-c,V2,HB,rA带):以菌株g-c为代表,这是不同于其他菌株的1个新带型,仔细观察g-c型有3条带,1条带在最前面,另2条带在最后面,图1-B中后2条未分离开。分离菌株g-c,V2,HB,rA,gf,S均是该带型。菌株gf和S的图示省略。(2)R1型(图1-A中的R1带,图1-B中的R1带,3-0带),以标准菌株 *Rps. rutila* R1为代表,T群中的菌株III B,H3C,P,3-0,981,982的带型均与 *Rps. rutila* R1的带型一致。该带型介于图1-A中g-c型的快带和17001带之间。(3)pal型(图1-A,图1-B中的17001带):以标准菌株 *Rps. palustris* ATCC 17001为代表,图1-A中虽则分离菌株T及YNS的带型与之一致。而图1-B中则分开。(4)T型(图1-A,图1-B中的T型):以T菌株为代表。这也是与其他菌株不同的新带型,在图1-A与17001带型相近,但电泳温度为55°C时(图1-B)则不相同。分离菌株T和YNS归属于此型。(5)jul型(图1-A中的

51105 带),以标准菌株 *Rps. julia* ATCC 51105 为代表。该带型位于 R1 带和 g-c 快带之间。

2.5 醌类及 DNA 相关性

分别测定了标准菌株 R1、ATCC51105、ATCC17001 和代表菌株 g-c、V2、YNS、T、3-0 的醌类组成,结果表明:ATCC51105 含有 Q-10 和 MK-10 作为其主要的醌类,其余各菌株都只含有 Q-10 不含 MK-10,这七株菌的总 DNA 杂交实验结果如表 4:

表 4 各代表菌株的 G+C mol% 及 DNA 相关性

Table 4 Levels of genomic DNA relatness between the representative strains

Group	Strains	Major quinone	G + C mol%	DNA~DNA hybridization		
				g-c	R1	17001
g-c group	g-c	Q10	61.2	100	16.8	17.7
g-c group	V2	Q10	61.5	80.3	15.2	18.1
T-group	3-0	Q10	64.8	13.3	71.3	30.5
T-group	T	Q10	67.2	34.6	56.8	30.2
T-group	YNS	Q10		12.5	46.5	30.2
Type strain	<i>Rps. rutila</i> R1	Q10	62.6	19.95	100	12.2
Type strain	<i>Rps. palustris</i> ATCC17001	Q10		7.0	14.7	100
Type strain	<i>Rps. julia</i> ATCC51105	Q10, MK10		3.0	3.1	4.2

Q:Ubiquinone; MK:Menquinone.

g-c 群内的 g-c 与 V2 两株菌的同源性为 80.3%,应为同一种。g-c 与 T 群菌的 3-0、T、YNS 以及 3 个标准菌株的同源性明显低于 20%,故 g-c 群很可能代表 *Rhodopseudomonas* 属的一个新种群;T 群中的 R1 型菌只选了 3-0 一株菌作杂交,结果 3-0 与 *Rps. rutila* R1 的同源性为 71.3%,当属同一个种;T 群的 2 株 T 型菌均作了杂交实验,它们与标准菌株 *Rps. rutila* R1 的同源性较高,分别是 56.8%、46.5%,但也低于 70% 的种的界定线,因此,也应该是 *Rhodopseudomonas* 属一个独立的新种群。

3 讨论

在 Hiraishi^[13]将两个绿色菌株 *Rps. viridis* 和 *Rps. fulfovirdis* 从 *Rhodopseudomonas* 属中独立出来成一新属(*Blastochloris*)后,*Rhodopseudomonas* 属只剩下 4 个种:*Rps. acidophila*, *Rps. julia*, *Rps. rutila* 和 *Rps. palustris*。由于 14 株分离菌的最适 pH 值为 6~8,需要生长因子,不呈桔棕色,菌体直径小于 1.0 μ m,且醌类主要成分不含单甲基萘醌,据此可与 *Rps. acidophila* 区分开^[7],故未用 *Rps. acidophila* 作对照及杂交试验。

分离的 14 株菌,依据表观特征,可分成明显的 2 个类群:T 群和 g-c 群;从遗传多样性上,可分成 3 个遗传型:T 型、R1 型和 g-c 型。其中 R1 型是标准菌株 *Rps. rutila* R1 的遗传型,而 T 型和 g-c 型则是不同于标准菌株的新遗传型。T 群菌株有 R1 型和 T 型 2 个遗传型,g-c 群的菌株均是 g-c 型。16S rRNA 基因片断的 DGGE 分析表明,T 型菌株有 6 个分离株(H3C、P、3-0、981、982、III B)与标准菌株 *Rps. rutila* R1 的带型一致,其中的代表菌株 3-0 与 *Rps. rutila* R1 的 DNA 杂交结果(同源性为 71%)也证明了二者是同一种。而 T 群中的菌株 T、YNS 与 3 个标准菌株 *Rps. rutila* R1、*Rps. palustris* ATCC17001 和 *Rps. julia* 的 DGGE 带型均不同,肯定存在遗传差异,而 DNA 杂交结果则说明,其与

Rps. rutila R1 的关系较近,但低于 70% 的同源性(56.8%、46.5%)似乎表明,这种差异大到足以将菌株 T 和 YNS 定为一个新种。最后结果将视 16S rRNA 序列结果而定。

g-c 群的六个菌株是用不同的培养基从生产菌肥的鸡粪发酵液中分离到的,其表型稍有差别,但 DGGE 带型一致,呈 3 条带。最初怀疑是菌株不纯造成,但 g-c 和 V2 又继续单菌落划线三代仍是原带型。很可能是同一菌株不同拷贝的 16S rRNA 基因的异源性所致。g-c 与 V2 带型一致, DNA 杂交结果表明, g-c 与 V2 是同一种(同源性为 80.2%),但与 T 群和 3 个标准菌株的同源性均小于 20%。很明显,该群菌株代表了 *Rhodopseudomonas* 属的新类群,初步得到的 16S rRNA 基因的序列结果也证实了这一点。

Rps. julia ATCC 51105 的菌体大小、氯化钠耐受性均与其他菌群明显不同,而醌类组成的差别和极低的 DNA 同源性(<5%)更说明该菌与其他各菌株是不同的属。RDP^[14](Ribosomal Database Project)数据库^[15]无该种的 16S rRNA 基因序列。故测了其序列,发现其序列与 *Rhodobium marinaria* 的 16S rRNA 基因序列完全相同。而 *Rhodobium marinaria*^[15]形态结构及生理生化特征正好与 *Rps. julia* ATCC 51105 的一致:光照营养培养物颜色为粉色,能在 1~10% 的氯化钠中生长,醌类主要组成成分为 Q-10 和 MK-10 等。因此 *Rps. julia* ATCC 51105 应是 *Rhodobium marinaria* 的同种异名。

Rps. palustris 是 *Rhodopseudomonas* 属的典型种,是最常见的紫色非硫细菌,但 DGGE 分析表明,我们的分离株均与之存在遗传差异,而 DNA-DNA 杂交试验证明这种差异是种间差异。

在传统细菌分类研究中,表现特征的描述是鉴定菌种的主要手段。但绝大多数表现特征具有很大的不确定性。因此要将一未知菌株分类鉴定到种,需要作大量的表现特征分析,以相互印证。即使如此,错误的鉴定分类仍时有发生。直接从 16S rRNA 基因分析入手,进行遗传多样性筛选,既可省去大量的重复工作,又可提高鉴定的准确性。因此, DGGE 技术在研究微生物多样性及开发微生物资源方面具有重要的应用意义。

参 考 文 献

- [1] 姚竹云,张肇铭. 应用与环境生物学报, 1996, 2(1): 84~89.
- [2] 张德民,黄志勇,杨惠芳. 微生物学报, 2000, 40(1): 14~20.
- [3] Muyzer G, Brinkhoff T, Nübel U *et al.* Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) in Microbial Ecology. p. 3.4.4.1-3.4.4.22. In: Akkermans A D L, van Elsas J D and de Bruijn F J. (ed.), Molecular Microbial Ecology Manual, 3rd ed., in press. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- [4] Teske A, Sigalevich P, Chen Y, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 4210~4215.
- [5] Garcia-Pichel F, Prufert-Bebout L, Muyzer G. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62: 3284~3291.
- [6] Buchholz-Cleven B E E, Rattunde B, Straub K L. *Syst Appl Microbiol*, 1997, 20: 301~309.
- [7] Imhoff J F, Trüper H G. The Genus *Rhodospirillum* and Related Genera. In: Trüper A, Dworkin H G, Harder M, *et al.* The Prokaryotes. 2nd ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 1992, 1: 2141~2155.
- [8] Hiraishi A, Muramatsu K, Urata K. *J Ferm Bioeng.* 1995, 79(1): 39~44.
- [9] Marmur J. *J Mol Biol*, 1961, 3: 208~218.
- [10] 林万明. 细菌分子遗传学分类鉴定法. 上海: 上海科学技术出版社, 1990, 86~92.
- [11] Marmur J, Doty P. *J Mol Biol*, 1962, 5: 1. ©中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [12] 阮继生, 刘志恒, 染丽糯, 等. 放线菌研究及应用. 北京: 科学出版社, 1990.
- [13] Hiraishi A. *Int J Syst Bacteriol*, 1997 **47**: 217~219.
- [14] Maidak B L, Olsen G J, Larsen N, et al. *Nucleic Acids Res*, 1997 **25**: 109~111.
- [15] Imhoff J F. *Syst Appl Microbiol*. 1983 **4**: 512~521.

PHENOTYPIC FEATURES AND GENETIC DIVERSITY OF STRAINS OF *RHODOPSEUDOMONAS**

Zhang Demin Huang Zhiyong Yang Huifang

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

Cao Wenwei Duan Junxin

(*Department of Biology, Liaoning Normal University, Dalian 116029*)

Abstract : 14 strains of purple non-sulfur bacteria and 3 type strains of *Rhodopseudomonas* were investigated by phenotypic characterizing, DNA-DNA hybridizing and DGGE analyzing. The characteristics of their morphology, structure and physiology show that 14 strains of isolates have the features of the genus *Rhodopseudomonas*: dividing asymmetrically by budding, lamellar intracytoplasmic membranes, presence of bacteriochlorophyll a and carotenoids of the normal spirilloxanthin series. On the base of their differences in morphology, growth, carbon sources 14 strains can be divided into 2 groups: g-c group, T group. Parts of 16S rRNA gene were amplified by using a pair of primers: 341f-906r. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR-amplified fragment of rDNA indicated that they have 3 genetic types: 1 of them, including 6 of 8 strains of T groups is similar to that of *Rps. rutila* R1, the other 2 types, represented separately by 2 of T group or all the g-c group, were different from that of either of 3 type strains. The Data of the DNA-DNA hybridization of 8 representative strains indicated that the differences between different types were enough to separate them into different species including 2 possible new species.

Key words : Purple non sulfur bacteria, *Rhodopseudomonas*, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Genetic diversity