

除莠活性链霉菌的系统发育研究及其活性产物分析

石楠¹ 张利平^{1*} 吕志堂¹ 杨润蕾¹ 刘志恒²

(¹ 河北大学生命科学学院 教育部微生物资源重点实验室 保定 071002)

(² 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 从云南地区土壤中分离到一株具有除莠活性的放线菌(*Actinomycetes*),对其产生的活性物质进行了分离、纯化及分析。从该菌株的发酵液中获得具有除莠活性的黄色结晶,薄板层析的结果表明,该结晶为多组分混合物,且每一组分均具有除莠活性。通过红外分析对其组分作了初步鉴定。同时对该菌株进行了形态、化学及系统发育学研究,根据 16S rDNA 全序列构建了系统发育树,结果表明此菌株应属于链霉菌属(*Streptomyces*),同时具有耐低温和耐盐的特性。

关键词 链霉菌 除莠活性 活性产物 系统发育

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)02-0148-05

杂草危害是一个世界性问题。近年来,微生物各种复杂的代谢产物和新奇的分子结构、作用机理以及商业化前景受到越来越多的重视,微生物来源的天然农药产物也开始发挥重要作用^[1,2]。随着土壤生物学与杂草学联系的加强,微生物除莠剂的开发迅速兴起;与化学合成的农药相比,它具有无残毒、无污染和经济效益高等优点。利用微生物发酵产生新型除莠剂的前景非常广阔^[3,4]。本文报道了一株具有除莠活性的链霉菌菌株的系统发育学及其产生的除莠活性物质的研究结果。

1 材料和方法

1.1 菌种

分离自云南地区的土样,经筛选具有除莠活性的放线菌(*Actinomycetes*)菌株 40003。菌株的活性筛选方法参见文献[5]。

1.2 活性物质的发酵与提取

方法参考文献[6]并有所改进。菌种自斜面接种于液体培养基中,28℃,180r/min,摇床培养 48~72h。培养基成分为:每升含葡萄糖 2.5g,大豆蛋白胨 1g,牛肉膏 0.1g,酵母膏 0.25g,KCl 0.4g,(NH₄)₂SO₄ 0.5g,K₂HPO₄ 0.02g,CaCO₃ 0.3g,pH7.2。之后再以 5% 的接种量接种于相同培养基中(约 5L),进行扩大培养 48~72h。

发酵液离心后取上清,用旋转薄膜蒸发器 42℃ 浓缩至原来的 1/6,酸化后与两倍体积乙酸乙酯混合,分装至摇瓶于摇床上振荡抽提 4~5h (180r/min),收集上层乙酸乙酯相;下层水相重复上述步骤,收集上层与前次乙酸乙酯相混合再用旋转蒸发器浓缩至原来的 1/6,用两倍体积 0.5% NaHCO₃ 溶液洗涤两次,每次均分液去水相;一倍体积饱和 Na₂CO₃ 溶液洗涤两次,分液去除水相。将乙酸乙酯相用旋转蒸发器 30℃ 蒸干,所得产物溶于约 50mL 甲醇后用 2g 活性炭吸附,离心去上清。用甲醇洗涤活性炭后离心。用 50mL 乙酸乙酯分两次洗脱,离心后蒸干乙酸乙酯即得产物。

1.3 活性产物的纯化与鉴定

将菌株提取物溶于少量乙酸乙酯中,用毛细管点样于 GF254 型硅胶板上,以己烷:乙醚 = 85:15 为流动相展层。层析后在 254nm 紫外灯下分别刮下各带,用少量甲醇溶解后离心去硅胶。

将产物的甲醇溶液分成两份,一份用红外吸收仪进行测定;另一份用蒸馏水稀释,加入吐温 80 作为表面活性剂,以相同剂量滴于狗尾草、酢浆草和番茄的叶片表面,同时以不加产物的相同溶液为对照,24~48h 后观察其除草活性。

1.4 菌株研究

1.4.1 形态学研究 将菌株涂布于 Bennett 琼脂平

基金项目 国家自然科学基金(39970001) 河北省自然科学基金(395075)

* 通讯作者。Tel:86-312-5079696; Fax:86-312-5065533; E-mail:Zhlping@mail.hbu.edu.cn

作者简介 石楠(1977-),女,河北保定人,硕士,研究方向为微生物系统学。E-mail:eshishi@sohu.com

其他作者 郭辉娟,渠辉,孙红启。河北大学生命科学学院。

收稿日期 2003-01-30,修回日期 2003-11-17

板(每升含 10g 葡萄糖、2g 酶解酪素、1g 酵母膏、1g 牛肉膏、pH7.3),将盖玻片以 30°角斜插入培养基,28℃培养 6d,选择菌丝生长良好的玻片进行扫描电镜观察并拍照。

1.4.2 细胞壁化学组分分析:参考 Hasegawa 和王平的细胞壁化学组分的分析方法^[7,8]以及 Lechevalier 的纯细胞壁分析方法^[9]。

1.4.3 磷酸类脂分析:参照 Lechevalier 的磷酸类脂分析方法^[10]。

1.4.4 甲基萘醌分析:参照 Collins 的方法^[11]。

1.4.5 生理生化特征实验:参照文献[12]中相应属、种鉴定的有关内容选择生理生化试验性状。主要进行了唯一碳源生长试验、降解活性试验、酶类产生试验、硝酸盐还原试验、生长温度试验等^[13]。

1.4.6 菌株 16S rDNA 序列测定:菌种自斜面接种于 Bennett 液体培养基中,28℃,180r/min,摇床培养 48~72h。镜检确定无杂菌后离心收集菌体。菌体总 DNA 的提取参考 Kutchma 的方法进行并有所改进^[14],以 16S rDNA 通用引物^[15]进行扩增,扩增产物的纯化与测序由大连宝生物(TaKaRa)公司进行。

1.5 系统发育树的构建

首先用 BLAST 方式将测定的序列与 GenBank 中的序列比较,然后从 GenBank 中获得和试验菌株序列相近种属的 16S rDNA 序列,构建系统发育树。序列对排用 CLUSTAL X 1.81,进化距离的计算用 PHYLIP 软件包中的 DNADIST 程序,进化树的构建用 PHYLIP 软件包中的 Neighbor-joining 进行,分支模式的重复性用 PHYLIP 中的 SEQBOOT 和 CONSENSE 分析,重复次数选用 100,生成的树用 Treeview 重建。

2 结果

2.1 菌株的除莠活性

按照前述方法,从菌株 40003 的发酵液中提取并纯化得到了一种黄色结晶。将这种黄色结晶溶于乙酸乙酯后进行薄板层析,产生了 5 条位置区分明显且宽窄不同的带,表明该结晶是一种混和物,主要有 5 种组分且含量各异,将每一组分进行活性实验,发现它们均具有一定的除莠活性,滴加至叶片的 24~48h 后可在双子叶杂草酢浆草的叶片上形成枯斑,枯斑呈枯黄色,明显区别于周围绿色的叶片组织,同时对双子叶的番茄叶片无影响,但对单子叶杂草狗尾草无除草活性。由此可以初步认为,菌株 40003 产生的是一种具有选择活性的除莠物质,它的作用强度及应用范围有待进一步的确定。

2.2 各组分红外吸收光谱图

将活性产物的 5 个组分分别经红外吸收进行检测,得到了如下 5 个图谱(图 1),每个图谱对应一种组分。从红外光谱图中官能团区的特征伸缩振动来看,可以初步推断图中的特征吸收峰为酰胺基团的吸收峰,即 5 个组分均含有酰胺基团,其具体结构需要借助其他检测方式进行确定。这些活性物质是否是全新的物质及各组分结构式的确定都在进行中。

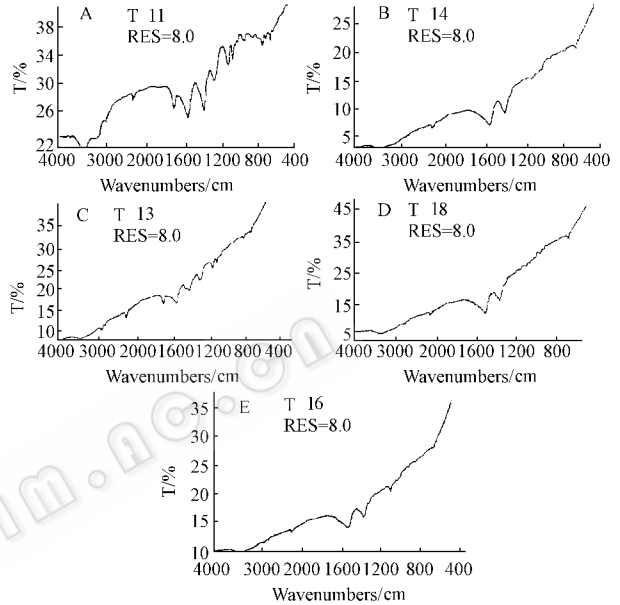


图 1 活性产物各组分红外吸收光谱图

Fig.1 Infrared absorption spectrum of the each component of the active product (The abscissa shows wavenumbers, w/cm; the ordinate shows transmittance%, T%)

A. Component A; B. Component B; C. Component C; D. Component D; E. Component E. Rf: A=0.47, B=0.58, C=0.65, D=0.77, E=0.81.

2.3 形态特征

菌株 40003 菌丝形态扫描电镜照片如图 2 所示。A 图中为孢子链,孢子光滑,圆杆形;B 图为圈卷的菌丝。从形态上看,菌株 40003 具备链霉菌属(*Streptomyces*)的形态学特征:基丝发育良好,气丝生有长的孢子链,孢子链分化为孢子,圆杆状。

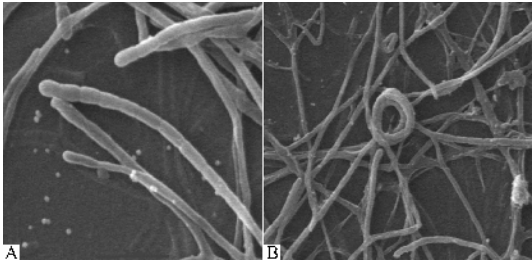


图 2 菌株 40003 的扫描电镜照片

Fig.2 Scanning-electronic microscope photograph of the strain 40003

2.4 化学分类结果

菌株 40003 的细胞壁化学组分为 :氨基酸 I 型 , 含 LL-DAP 糖型 C ,无特性糖 ;磷酸类脂 P I 型 ;甲基萘醌为 MK-9(H₄)。符合链霉菌属(*Streptomyces*)的化学分类特性。

2.5 生理生化特征

生理生化实验的结果表明 ,菌株 40003 能够以多种物质为唯一碳源生长如葡萄糖、果糖、麦芽糖、棉子糖、纤维二糖、肌醇、密二糖、鼠李糖、木糖、半乳糖、乳糖、甘露糖、甘露醇、蔗糖和甘油 ;具有降解鸟嘌呤、黄嘌呤和酪氨酸等有机复合物的能力 ;菌株可以产生脂肪酶、脲酶和淀粉酶 ,还可以降解酪素、液

化明胶 ,进行硝酸盐还原 ,也可利用七叶苷 ;并且菌株可在 4℃、10℃、28℃和 37℃ 中生长 ,以及可耐受 3%、5%、7% 和 10% 浓度的氯化钠。由上可见 ,菌株 40003 的生长条件比较宽泛 ,并且具有一定的耐低温(4℃)和耐盐(10% NaCl)的特性。

2.6 菌株 40003 的 16S rDNA 序列分析结果

通过对菌株 40003 的 16S rDNA 全序列进行测定获得了 1447 个碱基 ,与 GenBank 中的序列比较后从中获得和试验菌株序列相近种的 16S rDNA 序列 14 个 ,选择 *Nocardioides albus* AF004988 作为外群构建了链霉菌属(*Streptomyces*)系统发育树如图 3 所示。在这个发育树中 ,菌株 40003(GenBank 注册号

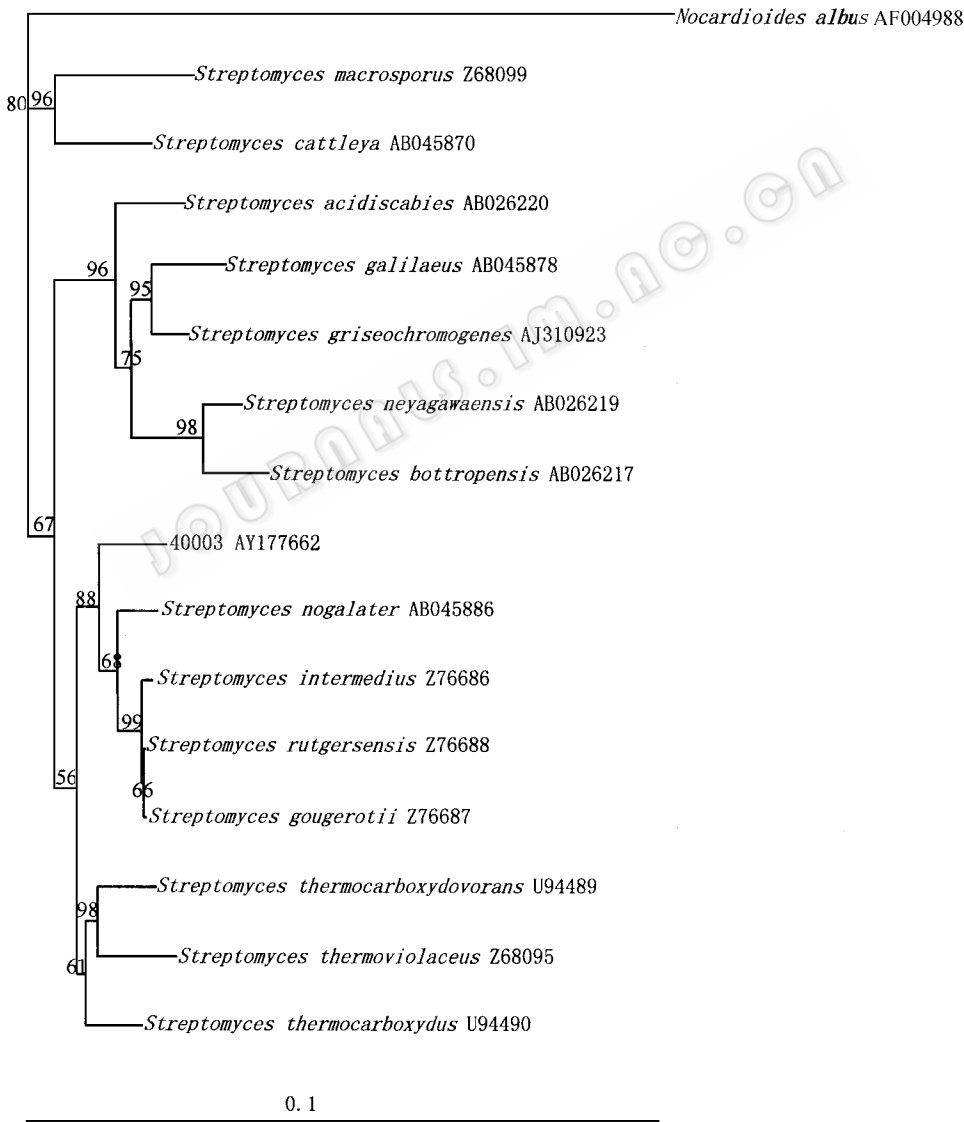


图 3 依据 16S rDNA 序列构建的链霉菌属(*Streptomyces*)的系统发育树

Fig.3 Neighbour-joining tree based on nearly completed 16S rDNA sequences showing relationship between 40003 and representative strains of *Streptomyces*

The scale bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide position. Seqboot values were showed on the branches.

为 AY177662)与黑胡桃链霉菌(*Streptomyces nogalater*)中间型链霉菌(*Streptomyces intermedius*)鲁地链霉菌(*Streptomyces rutgersensis*)和谷氏链霉菌(*Streptomyces gougerotii*)关系较近,聚成小群,序列相似性依次为 98.5%、97.91%、97.98%和 97.98%;其中与黑胡桃链霉菌(*Streptomyces nogalater*)的序列相似性最高。结合形态、细胞化学及 16S rDNA 全序列分析的系统发育研究结果,可以将菌株 40003 的分类地位确定至属的水平,即:菌株 40003 属于链霉菌属(*Streptomyces*),并且与黑胡桃链霉菌(*Streptomyces nogalater*)具有高于 98% 的 16S rDNA 序列相似性。

3 讨论

微生物源除莠剂就是利用微生物含有的能杀死杂草的活性物质(植物毒素)进行杂草防治的除莠剂^[16]。迄今报道的杂草病菌有百余种,自 1976 年报道相模湾链霉菌(*Streptomyces saganonensis*)能产生触杀型除草剂——杀草菌素(Herbicidin)以来,已建立了一系列有效的筛选方法,先后发现了十多个典型的除草活性物质,它们中大多数是链霉菌产生的。国内有关除莠剂研究起步较晚,只有少数几种微生物源除莠剂商业化^[16~20]。

本文报道的菌株 40003 产生的除莠活性物质为多组分混和物,每一组分都具有除莠活性,可以在酢浆草(双子叶杂草)叶片表面形成枯斑,而对狗尾草(单子叶杂草)无作用,表现出对单子叶杂草和双子叶杂草的选择抑制作用,同时对作物无害。薄板层析结果显示出了不同宽度的带,说明各组分的含量不同。由红外吸收光谱图中的特征吸收峰看,可以初步推测各组分均含有酰胺基团,是否是全新的物质及其单一组分的具体结构都有待进一步的研究。

从图 2 中可以看出,菌株 40003 的气生菌丝有圈卷,可形成孢子丝,根据其形态及化学分类的结果,符合链霉菌属(*Streptomyces*)的特征;在以 16S rDNA 序列分析结果构建的系统发育树上,菌株 40003 与黑胡桃链霉菌(*Streptomyces nogalater*)、中间型链霉菌(*Streptomyces intermedius*)、鲁地链霉菌(*Streptomyces rutgersensis*)和谷氏链霉菌(*Streptomyces gougerotii*)聚成小群,其近似种为黑胡桃链霉菌(*Streptomyces nogalater*)。生理生化实验结果表明,菌株 40003 可以利用多种碳源和氮源,特别是可以在 4℃ 环境中及在含 10% NaCl 的培养基上良好生长,说明该菌具有耐低温与耐盐的特性,可能为新种,种的定名及其同源性分析将在后续工作中进行。

本文的报道为微生物资源学的研究提供了宝贵资料,也为微生物来源的新型除莠剂的开发应用提供了潜在的菌种资源。

致谢 感谢云南大学微生物资源教育部重点实验室姜成林教授和徐丽华教授的大力协助。

参 考 文 献

- [1] 刘常林,李玉新,王晓毅. 结构新颖的微生物源除草化合物及其作用特征. 湖南化工, 1999, 29(1): 4-6.
- [2] 任康太,杨华铮. 除草剂的现状及发展趋势. 河南化工, 1997, 6: 3-6.
- [3] Jackson M A, Schisher D A. Fermentation strategies for improving the fitness of a bioherbicide. *Weed Technology*, 1996, 10: 645-650.
- [4] Satoshi O, Yuzuru I, Yoko T, et al. A new antibiotic produced by a strain of *Streptomyces*. *J Antibiotics*, 1979, 2(4): 255-261.
- [5] 张利平,张茜,刘志恒,等. 几株具有除莠活性的活性放线菌的鉴定. 微生物学报, 1998, 38(3): 233-236.
- [6] 阮继生,刘志恒,梁丽糯,等. 放线菌研究及应用. 北京:科学出版社, 1990.
- [7] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, 29: 319-322.
- [8] 王平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法. 微生物学通报, 1986, 13(5): 228-231.
- [9] Lechevalier M P, Lechevalier H A. Special publication N. 6. In: Deity A, et al. ed. *The Society for Industrial Microbiology*. Arlington: Arlington V A, 1980, 227-291.
- [10] Lechevalier M P, Stern A E, Lechevalier H A. *Actinomycetes*. New York: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1981, 111-116.
- [11] Collins M D. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. London: Academic Press, 1985, 267-285.
- [12] Holt G J, Krieg R N, Sneath H A P, et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [13] Gordon R E, Barnett D A, Handerman J E, et al. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the Nocardin strain. *Int J Syst Bacteriol*, 1974, 24: 54-63.
- [14] Kutchma A J, Roberts M A, Knaebel D B, et al. Small-scale isolation of genomic DNA from *Streptomyces* mycelia of spores. *BioTech*, 1998, 24: 452-457.
- [15] Stackebrandt E, Liesack W. *Handbook of New Bacteria Systematic*. ed. London: Academic Press Ltd, 1993.
- [16] 刘新平,马德英. 生物除草剂的研究与开发. 世界农业, 1994, 9: 36-37.
- [17] Blumauerova M, Kristufek V, Jizba J, et al. *Bioactive Metabolites from Microorganisms*. ed. Amsterdam Netherland: Elsevier Science Publishers B. V, 1989: 237.
- [18] 连云阳. 除莠剂. 国外医药抗生素分册, 1996, 2(1): 45-46.
- [19] 刘焕禄,刘亦学,刘晓林. 微生物除草剂的研究概况与建议. 天津农学院学报, 2000, 12: 36-39.
- [20] <http://www.pesticideinfo.com>, 2001, 12.

Study on The Herbicide Produced by A Strain of *Streptomyces* and Systematics of The Strain

SHI Nan¹ ZHANG Li-Ping^{1*} LU Zhi-Tang¹ YANG Run-Lei¹ LIU Zhi-Heng²

(¹ Microbial Resources Emphasis Library of National Ministry of Education , College of Life Sciences , Hebei University , Baoding 071002 , China)

(² Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)

Abstract : The herbicidal active substance produced by a strain of *Actinomyces* , isolated from soil samples collected in Yunnan , China , was extracted , purified and analyzed. Yellow crystal was obtained from fermented broth of the test strain. It 's definite that it 's mixtures of several compositions through chromatographic analysis by the thin-layer chromatography (TLC) and each of them has herbicidal activity. Each component was analyzed through infrared absorption spectrum. Meanwhile , phylogenetic analysis of the strain , including morphology , physiological and biochemical characters and chemotaxonomy , were performed and phylogenetic tree was constructed based on the 16S rDNA sequences. It 's also found that this strain can tolerate low temperature (4℃) and the concentration of 10% NaCl.

Key words : *Streptomyces* , Herbicidal activity , Active products , Phylogenetics

Foundation item : Chinese National Nature and Science Foundation (39970001)

* Corresponding author. Tel : 86-312-5079696 ; Fax : 86-312-5065533 ; E-mail : Zhlping@mail.hbu.edu.cn

Received date : 01-30-2003

The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

EDITOR-IN-CHIEF

LI Ji-Lun Academician
(College of Biology , Chinese Agricultural University , Beijing 100094 , China)

VICE-EDITOR-IN-CHIEF

TAN Hua-Rong Professor
(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)
LU De-Ru Professor
(Institute of Genetics , Second Military Medical University , Shanghai 200433 , China)
WANG Ao-Quan Professor
(Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China)
QU Yin-Bo Professor
(School of Life Science , Shandong University , Jinan 250100 , China)
XU Jian-Guo Professor
(National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control , Chinese Center for Disease Control and Prevention , Beijing 102206 , China)

MEMBERS OF THE BOARD

CAI Yong-Feng	CHEN Yong-Qing	CHENG Chi	DONG Xiu-Zhu	FAN Yun-Liu
GUO Jun	HU Fu-Quan	HU Yuan-Yang	HUANG Li	LU Cheng-Ping
MIN Hang	QIAN Shi-Jun	SHAO Yi-Ming	SHENG Jun	TANG Hong
TIEN Po	WANG Ping	WANG Hua-Ming (USA)	XIE Hong	YANG Su-Sheng
ZHAI Zhong-He	ZHANG Yao-Ping (USA)	ZHENG Tian-Ling	ZHU Bao-Quan	ZHUGE Jian

MANAGING EDITORS

WANG Jin-Fang WANG Min