

## 酸性土壤中嗜酸稀有放线菌的多样性研究

崔庆锋<sup>1,2</sup> 王黎明<sup>1</sup> 刘志恒<sup>1</sup> 杨公明<sup>2</sup> 黄 英<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup>西北农林科技大学食品科学与工程学院 杨凌 712100)

**摘 要** 从江西、云南、北京采集的 10 份酸性土样中分离出嗜酸放线菌 252 株,其绝大部分为链霉菌。通过形态观察、pH 梯度生长实验和细胞壁化学组分分析筛选出稀有放线菌代表菌株 20 株。ARDRA 分析表明,它们呈 11 种不同的图谱类型,其中 9 株的图谱相同,另外 4 株的图谱与之差异不大,而其余 7 株的图谱与之差异很大且各不相同。16S rDNA 序列分析表明,20 株稀有放线菌中的 18 株分别属于 6 个已知属,其中 13 株属于诺卡氏菌属(*Nocardia*),它们在系统发育树上处于多个进化分枝;各有 1 株分别属于壤球菌属(*Agrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)、考克斯菌属(*Kocuria*)和嗜酸链霉菌属(*Streptacidiphilus*);其余 2 株是迄今尚未定名的一个新科("Ellin5034 group")中的成员。实验结果显示,酸性土壤中的嗜酸稀有放线菌具有较丰富的种属多样性,其中诺卡氏菌属(*Nocardia*)是一优势菌群。

**关键词** 嗜酸放线菌 稀有放线菌 ARDRA 多样性

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0571-05

嗜酸放线菌(*Acidophilic actinomycetes*)广泛分布于酸性环境中,尤其是土壤<sup>[1-3]</sup>。它们产生耐酸的胞外酶,如几丁质酶、淀粉酶、蛋白酶等<sup>[4]</sup>,在酸性土壤有机物的降解循环中起着重要作用<sup>[5]</sup>。此外,由于酸性环境是大多数真菌的栖息地,所以嗜酸放线菌也是极具潜力的抗真菌活性物质的产生者<sup>[6]</sup>。因此,研究酸性环境中嗜酸放线菌的种属多样性,对于阐明它们的生态作用、寻找和发现新的天然活性物质及其产生菌具有相当重要的意义。

早在 1928 年 Jensen<sup>[7]</sup>就从酸性土壤中分离到 4 株嗜酸放线菌菌株,并把它们描述为放线菌属的一个新种——嗜酸放线菌(*Acidophilus actinomyces*)。但此后相当长一段时间没有人对这类微生物进行分类学方面的研究。从上个世纪 70 年代以来的研究表明<sup>[2,3,8]</sup>,根据数值表型分类特征,嗜酸放线菌分为两大类群,即中度嗜酸放线菌(*Neutrotolerant acidophilic group*)和严格嗜酸放线菌(*Strictly acidophilic group*)。中度嗜酸放线菌可以在 pH 3.5 或 4.5 至接近中性(pH 7.5)的条件下生长,而严格嗜酸放线菌的生长 pH 范围为 pH 3.5~6.5,且利用碳源的能力

比中度嗜酸放线菌强;它们的最适生长 pH 范围均为 4.5 至 5.5<sup>[3,8]</sup>。

迄今,对于嗜酸放线菌多样性的认识还很不够。研究主要集中在常见放线菌——链霉菌属(*Streptomyces*)上,国外以往<sup>[3,8]</sup>和最新<sup>[9]</sup>的研究都显示,中度嗜酸放线菌包括分类学上分散的多个群,但都落在链霉菌属的分类范围之内。近来,Kim 等<sup>[10]</sup>对 3 株严格嗜酸放线菌进行了多相分类研究,发现它们在系统进化树上形成与链霉菌属平行,但独立于链霉菌属之外的单独分枝,由此建立了嗜酸链霉菌新属(*Streptacidiphilus* gen. nov.)。我们从我国酸性土壤中分离纯化了一批嗜酸放线菌,通过表型特征、细胞壁化学特征、16S rDNA 扩增后限制酶分析(Amplified rDNA restriction analysis, ARDRA)及 16S rDNA 序列分析,研究了链霉菌属以外的嗜酸稀有放线菌的种属多样性。

## 1 材料和方法

### 1.1 土壤

样品来源、植被情况和酸度见表 1。

基金项目:国家教委微生物资源重点实验室开放基金;国家自然科学基金(3027003);英国皇家学会中英合作项目(Q814)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62553628; E-mail: huangy@im.ac.cn

作者简介:崔庆锋(1979-),男,河南安阳人,西北农林科技大学硕士研究生,主要从事放线菌系统分类学研究。

其他作者:张亚美<sup>1</sup>

收稿日期:2003-12-17,修回日期:2004-04-23

<sup>△</sup>Londsdale J T. Aspects of the biology of acidophilic actinomycetes. PhD thesis, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK, 1985.

表 1 土壤样品来源、植被和酸度

Table 1 The source, vegetation plant and acidity of soil samples

Sample	Location	Vegetation	pH
1	The foot of Wushan copper mine, Ruichang city, Jiangxi Province	Ruderal	3.47
2	The natural pine forest 10 metres west to the tomb of Yaobang Hu in Gongqing town	Pine	3.97
3	Rhizosphere soil of wild tea plants in the campus of Jiangxi Agricultural University	Tea plants	4.47
4	The taiga in Jiangxi Agricultural University	Pine	4.23
5	Xikeng fir forest, Anfu county, Jiangxi Province	Artificial fir forest	3.24
6	The pine forest in Diaocen Mountain, Yunnan Province	Pine	5.92
7	The pine forest, Yunnan Province	Pine	6.00
8	The broadleaf forest in Diaocen Mountain, Yunnan Province	Aspen	5.45
9	The artificial pine forest, Miyun county, Beijing City	Pine	5.51
10	The natural pine forest, Miyun county, Beijing City	Pine	5.86

## 1.2 培养基和试剂

选择分离培养基参照文献 [11]。燕麦培养基：每升含燕麦粉 20g，微量盐溶液 0.1% (V/V)，琼脂 20g，pH 4.5。Bennett's 液体培养基：每升含酵母抽提物 1g，牛肉膏 1g，水解酪素 2g，葡萄糖 1g，pH 4.5 ~ 5.5。PCR 试剂购自鼎国公司，限制性内切酶购自 Biolabs。

## 1.3 嗜酸放线菌的分离、纯化和保藏

采用分散和差速离心法 (Dispersion and differential centrifugation, DDC)，用 pH 4.5 的选择分离培养基进行分离 [11]。将所得的单菌落挑至 pH 4.5 的燕麦培养基进行纯化。纯培养物的孢子或菌丝体置于 20% 的甘油中，-20℃ 保藏。

## 1.4 形态观察

肉眼观察气丝、基丝和色素颜色，插片法显微镜观察菌丝形态。

## 1.5 pH 梯度生长试验

用 pH 3.5、4.5、5.5、6.5 和 7.5 的缓冲液配制的燕麦培养基，参照文献 [11] 所述方法进行。

## 1.6 细胞壁氨基酸组分分析

按照 Hasegawa [12] 的方法分析代表菌株的细胞壁二氨基庚二酸 (DAP) 组分。链霉菌属和嗜酸链霉菌属均为 LL-DAP。

## 1.7 总 DNA 的小量提取和 16S rDNA 的 PCR 扩增

用 Bennett's 液体培养基摇瓶培养收集菌体。参照 Chun 等 [13] 报道的方法进行总 DNA 的小量提取和 16S rDNA 的 PCR 扩增，扩增引物为通用引物 27f 和 1495r。

## 1.8 ARDRA 分析

取 15μL 16S rDNA 的 PCR 扩增产物，分别用限制性内切酶 *Bst* I 和 *Hha* I 进行酶切。酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.9 16S rDNA 测序和序列分析

测序引物为通用引物 27f、1115r 和 1495r。测序工作由上海联合基因公司完成。将实验菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比较，确定与实验菌株亲缘关系最近的种属。并从数据库获得相关种属的 16S rDNA 序列，构建系统发育树。序列对排用 CLUSTAL X1.8 program [14]，进化树的构建用 Neighbour-joining 方法 [15]。进化树分枝模式的稳定性用 PHYLIP 软件包 [16] 中的 SEQBOOT 和 CONSENSE program 进行 bootstrap 分析，重复次数为 1000。

## 2 结果

### 2.1 分离菌株的形态特征

从 10 份土壤样品中共分离到放线菌 252 株，它们的形态特征丰富多样。根据基丝、气丝和可溶性色素的颜色，将它们归为 36 个类群。从 36 个类群中挑选出代表菌株 43 株，插片观察形态表明，其中 25 株具有气丝、柔曲或螺旋的孢子链，基内菌丝分枝发达、无横隔、不断裂，与链霉菌形态特征相似；另外 18 株或基丝断裂，或气丝稀薄、无孢子链，或无明显分枝菌丝体，与链霉菌形态明显不同。

### 2.2 pH 梯度生长试验

燕麦培养基上 28℃ 培养 3 周后，根据菌落大小、基丝、气丝及孢子丝的丰茂程度判断菌株的生长状况。有肉眼可见菌落，但菌落很小或菌丝稀少的为弱生长，无肉眼可见菌落的为不生长。结果表明：所有代表菌株的最适生长 pH 都在 4.5 ~ 5.5 之间，在 pH 3.5 弱生长的有 9 株，在 pH 7.5 不生长的有 2 株，在 pH 7.5 弱生长的有 14 株。说明我们成功地分离到一批嗜酸放线菌。其中菌株 22202 在 pH 3.5 弱生长而在 pH 7.5 不生长，符合严格嗜酸放线菌的

生长 pH 范围。

### 2.3 细胞壁氨基酸组分分析

43 株代表菌株中, 24 株的细胞壁 DAP 为 LL-DAP, 15 株为 meso-DAP, 3 株不含 DAP, 1 株同时含有 LL-DAP 和 meso-DAP。24 株细胞壁 DAP 为 LL 型的代表菌株均具有链霉菌的形态特征, 其中包括菌株 22202。结合它们的 pH 生长特征, 菌株 22202 有可能属于嗜酸链霉菌属 (*Streptacidiphilus*), 而其他 23 株应属于链霉菌属; 计算它们所代表类群的菌株数在所有分离菌株中所占的比例, 可知分离的 252 株菌中, 约 90% 为链霉菌。15 株为 meso 型的和 3 株不含 DAP 的代表菌株为上文所述形态与链霉菌不同的 18 株菌。结合形态和胞壁化学特征, 确定这 18 株菌为链霉菌属以外的稀有放线菌。菌株 52108 同时含有 LL 型和 meso 型 DAP, 并且形态特征类似链霉菌, 很可能属于北里孢菌属 (*Kitasatospora*)。

由此, 我们挑选代表菌株 22202、52108 和另外 18 株稀有放线菌共 20 株作进一步分析。

### 2.4 ARDRA 分析

综合 *Bst*U I 和 *Hha* I 的 ARDRA 多态性分析结果 (图 1-A、B), 20 株实验菌株可分为 11 种不同的图谱类型, 其中 9 株 (菌株 53119、1213、43401、42221、108、117、116、201 和 102; 泳道 A-I) 的图谱相同, 菌株 915 和 917 (泳道 J、K) 的图谱相同, 剩余的 9 株 (菌株 1208、211、210、101、22202、42302、52108、12202 和 12201; 泳道 L-U) 分别为不同的图谱类型。从图 1 还可看出, 9 株菌均相同的图谱 (泳道 A-I) 与另外 4 株 (泳道 J-N) 的图谱差异不大, 而与其余 7 株 (泳道 O-U) 的图谱差异很大且各有不同。

### 2.5 16S rDNA 序列分析

将实验菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据

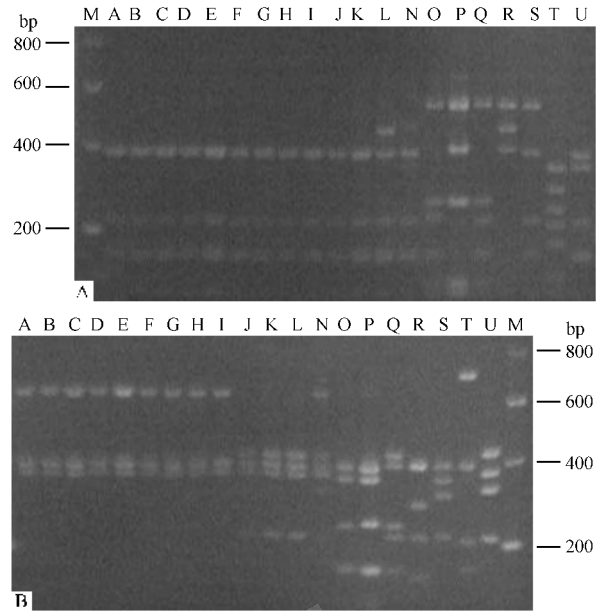


图 1 实验菌株 16S rDNA 的 *Bst*U I (A) 和 *Hha* I (B) 限制性酶切图谱

Fig.1 Restriction patterns of 16S rDNA of tested strains digested with *Bst*U I (A) and *Hha* I (B)

M. 100 bp DNA ladder; A. Strain 53119; B. Strain 1213; C. Strain 43401; D. Strain 42221; E. Strain 108; F. Strain 117; G. Strain 116; H. Strain 201; I. Strain 102; J. Strain 915; K. Strain 917; L. Strain 1208; N. Strain 211; O. Strain 210; P. Strain 101; Q. Strain 22202; R. Strain 42302; S. Strain 52108; T. Strain 12202; U. Strain 12201.

库中的已知序列进行比较分析, 结果表明, 挑选的 20 株稀有放线菌中, 有 18 株分别属于 6 个已知属, 其中 13 株属于诺卡氏菌属 (*Nocardia*), 其余 5 株分别属于壤球菌属 (*Agrococcus*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、北里孢菌属 (*Kitasatospora*)、考克斯菌属 (*Kocuria*) 和嗜酸链霉菌属 (*Streptacidiphilus*); 菌株 12201 和 12202 属于迄今尚未定名的科水平的类群 (New

表 2 根据 16S rDNA 序列分析所得的实验菌株的分类从属关系

Table 2 Phylogenetic affiliations of tested strains based on comparative analysis of their 16S rDNA sequences

The strain No. of representatives	The numbers of representatives	The numbers of isolates assigned to this group	Genus /Family	The closest species/Strain	Identities of 16S rDNA/%
102, 108, 116, 117, 201, 211, 915, 917, 1208, 1213, 42221, 43401, 53119	13	16	<i>Nocardia</i>	-	-
42302	1	1	<i>Agrococcus</i>	<i>Ag. jenensis</i>	99.0
210	1	1	<i>Arthrobacter</i>	<i>Ar. polychromogenes</i>	99.6
52108	1	1	<i>Kitasatospora</i>	<i>Ki. kifunense</i>	99.3
101	1	1	<i>Kocuria</i>	<i>Ko. rhizophila</i>	98.5
22202	1	3	<i>Streptacidiphilus</i>	<i>S. carbonis</i>	96.2
12201	1	1	"Ellin5034 group"	Bacterium Ellin5116	99.5
12202	1	1		Bacterium Ellin5119	99.4

family-level group, “Ellin5034 group”<sup>[17]</sup>(表2)。图2为13株诺卡氏菌实验株的进一步系统发育分析结果。菌株211、915、917、1208及1213在进化树上处于不同分枝,与它们最相近的已知种分别为 *N. crassostreae* (16S rDNA 相似性 99.7%)、*N. carnea* (99.0%)、*N. vinacea* (99.5%)、*N. uniformis* (99.7%)及 *N. alba* (99.6%)。菌株42221、43401和53119的亲缘关系极近,形成同一分枝,它们很可能属于同一个种,与 *N. nova* (98.8%)最相近;菌株102、116、117、201和108的关系也很近,聚成一簇,它们与 *N. pseudobrasiliensis* (98.0%~98.8%)最相近。

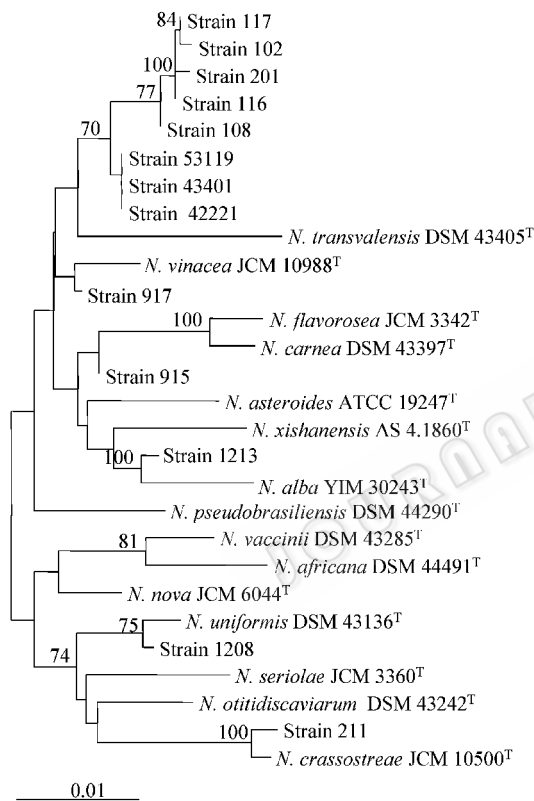


图2 依据16S rDNA序列构建的 *Nocardia* 实验菌株及相关种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of tested *Nocardia* strains

Bootstrap values (%) above 50% are shown at the nodes. The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position.

### 3 讨论

虽然现代分子生物学技术给放线菌分类带来了深刻的变化,但对于大量分离菌株的初步分类,传统的形态和胞壁化学分析仍然不失为一种有效手段。本实验中形态观察不是链霉菌的18株代表菌株,经16S rDNA序列分析证实,全部是属于链霉菌科之外

的稀有放线菌。其中13株诺卡氏菌的菌丝断裂,细胞壁含有 meso-DAP,符合 *Nocardia* 的特征;3株没有明显菌丝体的菌株101、210和42302,细胞壁不含DAP,与它们所属的考克斯菌属 (*Kocuria*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)和壤球菌属 (*Agrococcus*)的特征相符。修改后的链霉菌科包括3个属,北里孢菌属 (*Kitasatospora*)、嗜酸链霉菌属 (*Streptacidiphilus*)和数目庞大的链霉菌属 (*Streptomyces*)<sup>[11]</sup>。本实验依据pH生长范围和胞壁化学分析所挑选的两株具有链霉菌形态的代表菌株分属于该科的 *Kitasatospora* 和 *Streptacidiphilus*。*Streptacidiphilus* 目前只有3个有效发表种<sup>[11]</sup>,菌株22202与它们的16S rDNA序列相似性较低( $\leq 96.2\%$ ),很可能是该属的一个新种。

菌株12201和12202与所有放线菌已知种的16S rDNA序列相似性都很低( $< 94.0\%$ ),但与 Joseph等<sup>[18]</sup>最新分离的5株“未培养土壤细菌”(Uncultured soil bacteria)的相似性较高(98.9%~99.5%)。Joseph等<sup>[18]</sup>的系统发育分析表明,这5株菌形成放线菌进化树中的一个新科,位于小单孢菌科(Micromonosporaceae)和弗兰克氏菌科(Frankiaceae)之间。目前这个新科还未正式定名,也没有任何属于该科的分属单位描述。菌株12201和12202的ARDRA图谱明显不同(图1)形态也各异,12201的基丝为紫色,而12202的基丝为黄褐色,因此它们可能是该科中的不同分类单位。尚需进一步研究以确定其分类学地位。

本研究结果表明,酸性土壤中存在链霉菌属之外的多个属的嗜酸放线菌,其中诺卡氏菌属 (*Nocardia*)的数量占明显优势,中度嗜酸放线菌的数量远远超过严格嗜酸放线菌。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所的李炜博士在本研究过程中给予了许多技术援助。感谢英国 Newcastle 大学 Goodfellow M 教授和 Rodriguez C 博士对本实验的帮助。

### 参 考 文 献

- [1] Williams S T, Davies F L, Mayfield C I, et al. Studies on the ecology of actinomycetes in soil II. The pH requirements of streptomyces from two acid soils. *Soil Biol Biochem*, 1971, 3: 187-192.
- [2] Khan M R, Williams S T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil VIII: Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. *Soil Biol Biochem*, 1975, 7: 345-348.
- [3] Seong C N, Goodfellow M, Ward A C, et al. Numerical classification of acidophilic actinomycetes isolated from acid soil in Korea. *Kor J Microbiol*, 1993, 31: 355-363.

- [ 4 ] Williams S T , Flowers T H . The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic streptomycetes. *Microbios* , 1978 , **20** : 99 – 106 .
- [ 5 ] Williams S T , Robinson C S . The role of streptomycetes in decomposition of chitin in acidic soils. *J Gen Microbiol* , 1981 , **127** : 55 – 63 .
- [ 6 ] Williams S T , Khan M R . Antibiotics--a soil microbiologist 's viewpoint. *Post Hig I Med Dosw* , 1974 , **28** : 395 – 408 .
- [ 7 ] Jensen H L . *Actinomyces acidophilus* n. sp. – a group of acidophilus actinomycetes isolated from the soil. *Soil Sci* , 1928 , **25** : 225 – 236 .
- [ 8 ] Kim S B , Seong C N , Jeon S J , et al . Taxonomic study of neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2004 , **54** : 211 – 214 .
- [ 9 ] Kim S B , Lonsdale J , Seong C N , et al . *Streptacidiphilus* gen. nov. , acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae ( Waksman and Henrici ( 1943 ) AL ) emend. *Antoni van Leeuwenhoek* , 2003 , **83** : 107 – 116 .
- [ 10 ] 王黎明, 黄英, 崔庆锋, 等. 应用分散和差速离心法分离嗜酸和耐酸链霉菌的试验及评价. *微生物学通报*, 2003, **30** : 104 – 106 .
- [ 11 ] Hasegawa T , Takizawa M , Tanida S . A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Bacteriol* , 1983 , **29** : 319 – 322 .
- [ 12 ] Chun J , Goodfellow M . A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *Int J Syst Bacteriol* , 1995 , **45** : 240 – 245 .
- [ 13 ] Thompson J D , Gibson T J , Plewniak F , et al . The CLUSTAL-X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res* , 1997 , **25** : 4876 – 4882 .
- [ 14 ] Saitou N , Nei M . The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* , 1987 , **4** : 406 – 425 .
- [ 15 ] Felsenstein J . PHYLIP ( phylogenetic inference package ) version 3.5c. Department of Genetics , University of Washington , Seattle , USA , 1993 .
- [ 16 ] Joseph S J , Hugenholtz P , Sangwan P , et al . Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* , 2003 , **69** : 7210 – 7215 .

## Study on Diversity of Acidophilic Rare Actinomycetes from Acidic Soil

CUI Qing-Feng<sup>1,2</sup> WANG Li-Ming<sup>1</sup> LIU Zhi-Heng<sup>1</sup> YANG Gong-Ming<sup>2</sup> HUANG Ying\*

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

(<sup>2</sup> College of Food Science and Engineering , Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry , Yangling 712100 , China )

**Abstract** : 252 acidophilic actinomycetes were isolated from 10 acidic soil samples collected in Jiangxi Province , Yunnan Province and Beijing . About 90% of them were streptomycetes . 20 representatives of rare actinomycetes were selected by a combination of morphological feature , pH range for growth and cell wall amino acid component . They gave 11 different ARDRA patterns when digested with enzymes *Bst*U I and *Hha* I . 9 strains shared the same ARDRA pattern , which was moderately similar to the patterns of another 4 strains and distinct from those of the remaining 7 strains . On the basis of 16S rDNA sequence analysis , 18 of the 20 selected strains were assigned to 6 recognized genera . 13 of them fall within the genus *Nocardia* , and the other 5 strains belong to genera *Agrococcus* , *Arthrobacter* , *Kitasatospora* , *Kocuria* and *Streptacidiphilus* , respectively . 2 of the selected strains are members of an as-yet-unnamed novel family ( "Ellin5034 group" ) . The results show the good diversity of acidophilic rare actinomycetes in acidic soil , with *Nocardiae* predominant .

**Key words** : Acidophilic actinomycetes , Rare actinomycetes , ARDRA , Diversity

Foundation item : Open Fund of The Key Laboratory for Microbial Resources of Education Board of China ; Chinese National Natural Science Foundation ( 3027003 ) ; Royal Society China-UK Joint Project ( Q814 )

\* Corresponding author . Tel/Fax : 86-10-62553628 ; E-mail : huangy@im.ac.cn

Other author : ZHANG Ya-Mei<sup>1</sup>

Received date : 12-17-2003