

## 高温链霉菌 24 # 的初步研究

李德舜<sup>1</sup> 苏忠锐<sup>1</sup> 孙 琦<sup>1</sup> 郭新平<sup>2</sup> 马井玉<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

(<sup>2</sup>山东省济宁市农业科学院 济宁 272100)

**摘 要** :从土壤中筛选得到一株产广谱、高活性抗真菌物质的链霉菌 24 # ,经测定对 25 种植物病原真菌有显著拮抗作用 ,其次代谢产物对病菌菌丝有断裂、扭曲、缢缩等致畸效应。16S rDNA 序列分析显示本菌株与模式菌株链霉菌 DSM44293<sup>T</sup> 的 16S rDNA 同源性为 98.93% ,但菌株形态特征、培养特征、细胞壁化学组分、生理生化特性等均不同于模式菌株 ,且 DNA 杂交率只有 22.54% ,建议为链霉菌属的一个新种 ,命名为山东链霉菌(*Streptomyces shandongensis* sp. nov. )。

**关键词** :山东链霉菌 ,抗真菌活性 ,DNA-DNA 杂交 鉴定 ,16S rDNA 序列

中图分类号 :Q939 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)05-0580-04

真菌是引发农作物病害的主要病源之一 ,但目前能够有效防治真菌病害的农药却很少 ,特别是具有广谱抗真菌病害的生物农药则更少<sup>[1]</sup>。因此 ,寻找新菌株 ,研究新的广谱抗真菌病害生物农药是十分必要的。

从土壤中分离筛选出一株能产广谱抗真菌物质的高温链霉菌 ,编号为 24 # ,通过平板琼脂移块法和发酵液管碟法测定 ,发现其代谢产物对多种植物病原真菌具有较强的抑制作用 ,故采取 16S rDNA 序列分析和传统菌种鉴定相结合的方法对其进行了分类鉴定 ,为今后的研究开发工作打下了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

链霉菌 24 # 从山东大学校园土壤中分离得到。高温一氧化硫链霉菌 DSM293<sup>T</sup> 由中国科学院北京微生物研究所提供。其它真菌、细菌等指示菌共 36 株(表 1)由山东大学生命科学学院菌种保藏室提供。

### 1.2 培养基和培养条件

链霉菌 24 # 培养采用高氏一号固体或液体培养基<sup>[2]</sup> ,细菌培养用牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[2]</sup> ,真菌培养用土豆汁固体培养基<sup>[2]</sup>和土豆汁半固体培养基 ,酵母膏麦芽汁培养基<sup>[2]</sup>。

链霉菌 24 # 发酵条件为 120r/min ,28℃ 摇床振荡培养 8d。

### 1.3 抗菌活性试验

**1.3.1 平板琼脂移块法抗菌活性试验** :采用贴块

法<sup>[3]</sup>。用打孔器在链霉菌 24 # 平板上打出直径 0.8cm 的琼脂柱 ,用接种钩将琼脂柱移至高氏一号固体培养基底层平板中央 ,28℃ 恒温正置培养 2d ,后倒入接种有指示菌的半固体培养基混合液 ,使平板中底层培养基上附有薄薄的一层指示菌及其相应的培养基混合液。细菌 37℃ 培养 ,霉菌、酵母 28℃ ~ 30℃ 培养 ,记录抑菌结果并测量抑菌圈直径。

**1.3.2 发酵液管碟法抗菌活性试验** :采用管碟法<sup>[4]</sup>测定抑菌活性。制备指示菌菌悬液和测定平板 ,在制备好的平板上放置牛津杯 ,10min 后 ,吸取发酵液离心上清 200 $\mu$ L 于牛津杯中 ,28℃ 培养 36h 观察 ,记录抑菌结果并测量抑菌圈直径。

### 1.4 培养特征

在高氏合成一号琼脂、葡萄糖天门冬素琼脂、马铃薯浸汁琼脂、燕麦粉琼脂、无机盐淀粉琼脂、JCM 琼脂六种培养基上 28℃ 培养 7 ~ 15d 后观察菌丝体的颜色及色素。

### 1.5 对真菌菌丝形态的影响

以苹果腐烂菌做指示菌采用管碟法测定抑菌活性 ,待出现抑菌圈后 ,挑取抑菌圈边缘指示菌菌丝和正常培养的指示菌菌丝 ,经棉蓝染液染色 ,于光学显微镜 1000 倍油镜观察。

### 1.6 形态特征观察

于高氏合成一号琼脂和马铃薯浸汁琼脂上 28℃ 插片培养 7 ~ 10d 后 ,取插片用光学显微镜和电子显微镜观察菌株的气生菌丝、基内菌丝及孢子表面特征。

## 1.7 细胞壁化学组分分析

按快速薄层层析法(TLC)<sup>[5]</sup>对菌株进行全细胞水解液 DAF(二氨基庚二酸)氨基酸及糖型分析。

## 1.8 生理生化试验

参照《链霉菌鉴定手册》<sup>[6]</sup>有关内容对 24 # 菌株进行各项生理生化试验。

## 1.9 16S rDNA 序列分析

将待测菌株培养新鲜菌株,从中提取总 DNA,模板采用通用引物进行 16S rDNA 基因扩增,PCR 产物经检测纯化后,直接用 Taq DyeDeoxy Terminator cycle Sequencing Kit 测序,电泳及数据收集用 Applied Biosystems DNA Sequencer(model 377)自动进行。将所测的 16S rDNA 序列经校对后与 GenBank 数据库中相关种、属的序列进行比较,以确定该菌株的分类地位。

## 1.10 DNA-DNA 杂交

参照 Ezaki 等<sup>[7]</sup>(1989)的方法进行 DNA 杂交。每孔加入 100 $\mu$ L 0.2 OD 的变性 DNA 作为吸附 DNA,每个样品在 96 孔板(COSTAR)上重复 4 次;探针 DNA 超声剪切至 300~700 bp,标记物为 Photobiotin(Fluka);孔板用 200 $\mu$ L 不含探针 DNA 的预杂交液预杂交 1h 后,移除预杂交液,加入 100 $\mu$ L 的杂交液(含 125ng 标记 DNA)48 $^{\circ}$ C 杂交过夜。DNA 杂交百分率的测定参照 Christensen 等<sup>[8]</sup>(2000)的碱性磷酸酶标记链亲和素法进行测定和数据计算。以 4-methylumbelliferyl phosphate(4-MUP, Sigma)为底物,数据读取采用 BMG 公司的 FLUOstar 读板仪,350nm 激发,480nm 发射。

# 2 结果和分析

## 2.1 链霉菌 24 # 抑菌实验

通过平板琼脂移块法对链霉菌 24 # 进行抑菌试验即,发现在活性物质扩散到达的适当范围内,形成一定浓度的球形区,产生透明的抑菌圈。同时采用管碟法对链霉菌 24 # 发酵液进行抑菌试验,发现发酵液对所测 36 种指示菌中 3 种植物病原细菌和 25 种植物病原真菌有显著抑制作用(表 1)。

## 2.2 对真菌菌丝形态的影响

光学显微镜下,链霉菌 24 # 所产活性物质使苹果腐烂菌的菌丝出现空胞、膨大、缢缩等现象,正常生长的菌丝节间长、染色均匀、生长健壮(图 1)。

## 2.3 形态特征

在高氏合成一号琼脂和马铃薯浸汁琼脂上 28 $^{\circ}$ C 培养 9d 后,取插片观察到 24 # 菌株的基丝无横隔,

表 1 平板琼脂移块法及管碟法测定抑菌谱结果

Table 1 Inhibitory spectrum of the strain 24 #

Indicator strains	Punch method diameter of inhibition cycle/mm	Cylinder-plate method diameter of inhibition cycle/mm
<i>Pythium graminicola</i> Subram	-	15
<i>Helminthosporium sorokinum</i>	59	46
<i>Fusarium graminearum</i> Schw.	46	18
<i>Gaeumanomyces graminis</i>	67	34
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	45	15
<i>Phytophthora</i> sp.	42	30
<i>Verticillium albo-atrum</i>	38	36
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	41	16
<i>Valsa mali</i>	55	32
<i>Pyricularia grisea</i>	37	17
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	52	13
<i>Fusarium oxysporum</i>	41	34
<i>Rhizopus nigricaus</i>	53	18
<i>Mucor</i> sp.	43	36
<i>Aspergillus niger</i>	38	32
<i>Botrytis cinerea</i>	34	15
<i>Pythium aphanidermatum</i>	25	17
<i>Physalospora piricola</i>	43	33
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>mori</i>	41	22
<i>Helminthosporium carbonum</i> Ullstr	51	39
<i>Colletotrichum phomoides</i>	46	39
<i>Coniothyrium diplodiella</i>	47	21
<i>Rhizopus</i> sp.	23	9
<i>Alternaria alternata</i>	46	32
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	-	13
<i>Ralstonia solanacearum</i>	37	13
<i>Erwinia carotovora</i>	25	-
<i>Xanthomonas arylae</i>	34	-
<i>Erwinia herbicola</i>	50	28
<i>Corynebacterium sepednicum</i>	33	17
<i>Bacillus subtilis</i>	40	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	18
<i>Sarcinalutea</i>	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	-	-
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	-	-

Symbols: "-" No inhibition. Note: The average value of three repeats.

不断裂,生长丰茂,分枝多,气生菌丝生长稀少,无分枝,直丝有的略弯曲,孢子表面光滑(图 2)。

## 2.4 培养特征

表 2 为 24 # 菌株的培养特征。

## 2.5 菌株细胞壁化学组分

快速薄层层析法(TLC)测定,菌株 24 # 细胞皆含有 LL-DAF(含有左旋二氨基庚二酸),甘氨酸:

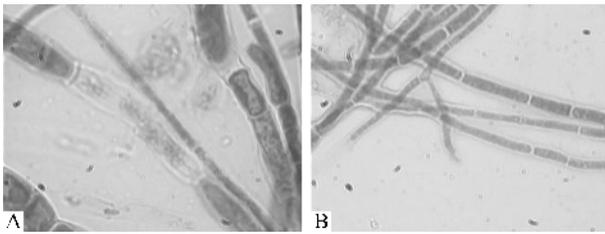


图 1 抑菌物质对苹果腐烂菌丝的影响 (1000 ×)

Fig.1 Effects of antifungal substance on the hyphal morphology of *Val-sa mali* (1000 ×)

A : Rupturing mycelium ;B : Natural mycelium ( CK ).

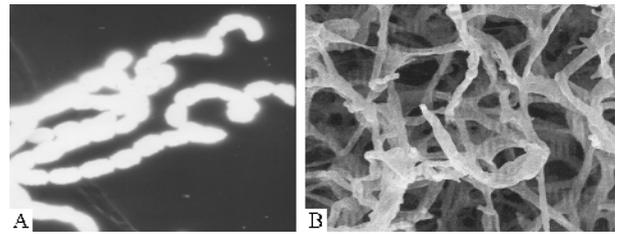


图 2 ( A )菌株 DSM 44293<sup>T</sup> 的孢子的形态( 10000 × ) ; ( B ) 24 # 菌株的孢子的形态( 10000 × )

Fig.2 ( A )Morphology of spore of strain DSM 44293<sup>T</sup> ;( B )Morphology of spore of strain 24 #

表 2 菌株 24 # 在 6 种培养基的培养特征

Table 2 Culturing characters of the strain 24 #

Medium	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Dissoluble pigment
Gaoshi NO.1 agar	Sparse , light cream	Brownish yellow	No
Dextrose aspartic agar	No	Yellowish	No
Ammonium salt starch agar	Sparse , light cream	Yellow-gray	No
Oat agar	Sparse , white yellow	Tan	No
JCM agar	Sparse , white	Gray-brown	No
PDA	Sparse , grayish white	Red-brown	No

表 3 24 # 菌株与 *S. thermocarboxydis* 生理生化特征比较

Table 3 Comparisons of Physiological and biochemical characteristics of the strain 24 # and *S. thermocarboxydis*

Characteristics	<i>S. thermocarboxydis</i>	24 #	Characteristics	<i>S. thermocarboxydis</i>	24 #
Use of Carbohydrates :			Gelatin liquefaction	+	+
D - fructose	+	+	Starch hydrolysis	+	+
Inositol	+	-	Degradation of urea	+	-
D-lactose	+	+	Melanin production	-	-
Mannose	+	+	Degradation of cellulose	-	-
Sucrose	-	+	Milk froze	-	-
Raffinose	-	-	Peptonization of milk	+	+
Rhamnose	-	-	Aerobic growth	+	+
D - Glucose	+	+	H <sub>2</sub> S producing	+	+
Arabinose	+	+	Nitrate reduction	+	+
Growth at 15°C	-	-	Anaerobic growth	-	-
20°C	+	+	Growth at :		
30°C	+	+	pH5.5	-	-
35°C	+	+	pH 6.5	+	+
45°C	+	+	pH 7.0	+	+
50°C	+	+	pH 7.5	+	+
55°C	-	Weak	pH 8.0	+	-
60°C	-	-			

Symbols : " + "Positive, " - "Negative.

无特征性糖( 糖型 C )。

## 2.6 生理生化特征

表 3 为 24 # 菌株与近似典型种 *S. thermocarboxydis* 生理生化特征比较。

## 2.7 16S rDNA 序列分析

链霉菌 24 # 16S rDNA 序列测定结果已经提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中 Accession numbers 是 AY569722。24 # 菌株的 DNA 序列与 GenBank 中相关序列 BLAST 比较,与目前正式发表的相关菌株比较 24 # 菌株属于链霉菌属。24 # 菌株与高温一氧

化碳链霉菌的序列同源性为 98.93%。

## 2.8 DNA-DNA 杂交结果

杂交结果显示菌株 24 # 与菌株 DSM44293T 的 DNA-DNA 同源性为 22.54% 远小于 70% ,表明菌株 24 # 与 DSM44293T 是不同的基因种 ,且两种菌株的生理生化特征相差较大。24 # 链霉菌气丝呈黄色 ,直丝孢少 ,而一氧化碳链霉菌气丝灰 ,孢子丝呈螺旋状 (图 2 ) ,因此认为该菌株为一新种 ,定名为山东链霉菌 (*Streptomyces shandongensis* sp. nov. )。

### 3 讨论

通过平板琼脂移块法及发酵液管碟法对链霉菌 24 # 抗菌谱的测定,显示其对所测 36 种指示菌中的 25 种植物病原真菌和 3 种植物病原细菌具有明显的抑制作用。其代谢产物若开发为生物农药用来防治常见难治农作物病害,将具有广阔的应用前景。

链霉菌 24 # 次生代谢产物使得植物病原真菌菌丝出现空胞、膨大、缢缩等现象,表现出一定的杀菌作用。产生这种现象的原因可能是真菌细胞壁上的纤维原结构变形<sup>[9]</sup>,其具体的杀菌机理还有待深入研究。随着分子生物学的发展,人们逐渐认识到单靠菌株的常规生理生化、形态特征为指标,而缺乏基因水平的数据作支持,已不足以对菌株鉴定提供充分有力的证据<sup>[10]</sup>。本研究采用 16S rDNA 序列分析、DNA 杂交和传统的菌种形态特征、生理生化、细胞壁化学组分分析相结合的方法,将其鉴定为山东链霉菌(*Streptomyces shandongensis* sp. nov.)。到目前为止,高温链霉菌仅有为数不多的几个种被发现并生效描述,鉴于高温链霉菌本身耐高温的特点及所产抗菌物质种类与性质的特殊性<sup>[11,12]</sup>,山东链霉菌的发现具有潜在的、重要的应用价值和理论意义。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所刘志恒、张亚美老师在菌株鉴定方面提供的指导和帮助。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] 尹莘耕. 抗生素、抗真菌素在农业上的应用. 应用微生物, 1979, 3: 35 - 41.
- [ 2 ] 郭秀君, 任建平, 迟振明. 微生物学. 山东: 山东大学出版社, 1996, 340 - 341.
- [ 3 ] 秦红敏, 张长铠. 竹荪的菌丝体培养及其抗菌性的初步研究. 微生物学通报, 1999, 26(6): 393 - 396.
- [ 4 ] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1980, 339.
- [ 5 ] 阮继生, 刘志恒, 宋丽糯, 等. 放线菌研究及应用. 北京: 科学出版社, 1990.
- [ 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.
- [ 7 ] Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E. Fluorometric deoxyribonucleic acid - deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol*, 1989, 39, 224 - 229.
- [ 8 ] Christensen H, Angen O, Mutters R, et al. DNA-DNA hybridization determined in micro-wells using covalent attachment of DNA. *Int J Syst Evol Bacteriol*, 2000, 50, 1095 - 1102.
- [ 9 ] 田黎, 顾振芳, 陈杰, 等. 海洋细菌 B-9987 菌株产生的抑菌物质及对几种植物病原真菌的作用. 植物病理学报, 2003, 33(1): 77 - 80.
- [ 10 ] Katayama Y, Hiraishi A, Kuraishi H. Phylogenetic analysis of *Eruinia* species based on 16S rDNA gene sequences. *Microbiology*, 1995, 141: 1496 - 1477.
- [ 11 ] 李文均, 张忠泽, 姜成林. 高温放线菌属分类研究进展. 微生物学报, 2002, 42(6): 759 - 763.
- [ 12 ] 田勇强, 张云峰, 李文军, 等. 自溶高温放线菌的生物学特性及 16S rDNA 序列分析的研究. 微生物学通报, 1999, 26(4): 268 - 271.

### A Preliminary Study on the *Thermostreptomyces* Strain 24 #

LI De-Shun<sup>1\*</sup> SU Zhong-Rui<sup>1</sup> SUN Qi<sup>1</sup> GUO Xin-Ping<sup>2</sup> MA Jing-Yu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> State Key Lab of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

(<sup>2</sup> Jining Academy of Agricultural Sciences, Jining 272100, China)

**Abstract**: The 24 # strain of *Streptomyces* sp. producing broad-scope high activities and antifungal substances were isolated from the soil. In screening process of agriculture antagonistic strains, *streptomyces* strain 24 # was isolated from soil in Shandong. The antifungal substances have notable antagonistic effects of phytopathogens and can cause the mycelia of the phytopathogens breaking, twisting and constricting. The 16S rDNA sequence homology between the strain 24 # and model strain S. DSM44293<sup>T</sup> is 98.93%. However, the morphological and culture characteristics, the chemical components of the cell walls, the physiological and biochemical characteristics of the strain are different to those of the model strain, and the ratio of the DNA-DNA hybridization is only 22.54%. The name *Streptomyces shandongensis* sp. nov. is proposed for strain 24 #.

**Key words**: *Streptomyces shandongensis* sp. nov., Antifungal activity, DNA-DNA hybridization, Identification, 16S rDNA sequence

\* Corresponding author. Tel 86-531-8364882; E-mail: lds@sdu.edu.cn

Received date 01-06-2004