

嗜热脂肪芽孢杆菌的表观群与亲缘群的关系

蔡妙英 洪俊华 刘聿太 王大帮

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用 DNA-DNA 体外杂交的方法考察了嗜热脂肪芽孢杆菌的表观群菌株的亲缘关系。按 DNA 同源性%形成三个亲缘群。亲缘群并不与表观群十分吻合, 却与 DNA 的 G + C 含量更相关。同一亲缘群菌株 DNA 的 G + C 含量相近, 然而 DNA 的 G + C 含量相近的并不一定属于同一亲缘群。表观群中各菌株的中心株距离也与 DNA 的 G + C 含量相关。DNA 的 G + C 含量接近中心株的菌株, 则它与中心株距离也相对地接近。结果表明嗜热脂肪芽孢杆菌是一个异源性的种。本文结果支持 Brenner 的主张: 将表观特征和遗传特征结合作为种的定义。

关键词 嗜热脂肪芽孢杆菌; DNA 杂交; 细菌分类

芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 内许多种虽然定义尚属明确^[1,2], 但仍有不少争论^[3]。我们曾用数值分类法对芽孢杆菌进行分类^[4], 发现嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 在 $S_{SM}=78.4\%$ 的水平, 形成明显的三个表观群。由于三个表观群的表观性状差别明显, 曾提出可否考虑将这个种划分为三个独立的种^[4]。本文用 DNA-DNA 体外杂交的方法, 考察这三个表观群菌株间的亲缘关系。

材料和方法

(一) 菌株来源

自前文^[4]所研究过的菌株中选取 9 株菌 (表 1)。

(二) DNA 的提取

菌株的培养方法按蔡妙英等^[1]。将按前法所得的 DNA 进一步处理, 即溶于 0.1 SSC, 并加入 1/5 体积的 1.0M 乙酸钠, 然后以两倍体积的无水乙醇沉淀 DNA。再用 70%、80%、90% 和 95% 的乙醇洗涤所沉淀的 DNA。最后将所得到的 DNA 溶于 0.1 SSC 中。

(三) G + C 克分子%的测定

通过测定溶解温度 (T_m) 计算 DNA 中的

G + C 含量^[5]。用恒温水浴为热源的 Sepcord UV 紫外分光光度计测定 T_m 值。DNA 的浓度为 20—30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 于 0.1SSC 溶液中测定。以大肠埃希氏菌 K12 为对照菌株。按公式 $G + C$ 克分子% = $(T_m - 53.5) \times 2.44$ 计算。每个样品至少测定两次, 取其平均值。

(四) DNA-DNA 同源性百分比的测定

DNA 的标记、小膜的制备、预处理及洗膜等基本过程按前文^[4]进行。本文将预温处理改为 60℃, 5—6 小时, 杂交反应的时间为 22—24 小时。每对菌株至少进行两次 DNA-DNA 杂交试验, 取其平均值。

结 果

(一) 嗜热脂肪芽孢杆菌 DNA 的 G + C 克分子%

嗜热脂肪芽孢杆菌的 G + C 克分子%测定结果列于表 2。结果表明嗜热脂肪芽孢杆菌 DNA 的 G + C 克分子%幅度甚大, 从 31.7% 到 53.2%, 幅度为 21.5%。

本文于 1983 年 8 月 8 日收到。

本试验得到我所孔令茂、曹家鳌二同志的大力支持, 并协助安装调试紫外分光光度计和井型 γ 计数器, 特此致谢。

表 1 所选用的菌株

Table 1 The list of strains

菌株号 No. of strains	菌名 Name of organisms	表观群 Phenon	在表观群中与中心株的距离 Distance to the central strains in phenons
17 18 29	嗜热脂肪芽孢杆菌 (<i>B. stearothermophilus</i>)	I	0 (中心株 the central strain) 0.016 0.184
48 52 59	..	II	0 (中心株 the central strain) 0.104 0.164
40 44 51	..	III	0.185 0.009 0 (中心株 the central strain)
AS 1.365	大肠埃希氏菌 K12 (<i>E. coli</i> K12)		

表 2 嗜热脂肪芽孢杆菌的 G + C 克分子%

Table 2 G + C mol% of *B. stearothermophilus*

菌株名称 Name	菌株号 No. of strain	G + C 克分子% G + C mol%
大肠埃希氏菌 K12 (<i>E. coli</i> K12)	AS 1.365	50.3
嗜热脂肪芽孢杆菌 (<i>B. stearothermophilus</i>)	17	53.2
..	18	52.8
..	29	33.6
..	40	44.8
..	44	36.2
..	48	35.8
..	51	32.3
..	52	33.9
..	59	31.7

(二) DNA-DNA 杂交

最初根据表观群^[4]选择 DNA-DNA 杂交的参考菌株,结果表明, DNA 杂交百分数并不完全反映表观群的关系。后来根据 DNA 的 G + C 克分子%选定 18 号菌株(G + C 克分子%为 52.8%)、48 号菌株(G + C 克分子%为 35.8%)和 59 号菌株(G + C 克分子%为 31.7%)为参考菌株,进行同位素标记。以这三株菌标记的 DNA 与其它未标记的 9 株实验菌株的

表 3 嗜热脂肪芽孢杆菌的 DNA-DNA 同源性%

Table 3 DNA-DNA homology % in strains of *B. stearomophilus*

同源性% Homology%	参考株 Reference strain	AS 1.365	18	48	59
测定株 Test strain					
<i>E. coli</i> AS 1.365		100	0	0	1.7
<i>B. stearothermophilus</i> 17		1	25.1	4.1	1
<i>B. stearothermophilus</i> 18		2.5	100	5.1	3.4
<i>B. stearothermophilus</i> 29		0.3	3.7	3.8	2.3
<i>B. stearothermophilus</i> 40		0.8	1.7	2.7	1.2
<i>B. stearothermophilus</i> 44		0.4	3.7	87.2	8.3
<i>B. stearothermophilus</i> 48		0.3	5.6	100	11.5
<i>B. stearothermophilus</i> 51		0.3	0.3	3.1	50.9
<i>B. stearothermophilus</i> 52		0.2	4.7	85.0	5.0
<i>B. stearothermophilus</i> 59		3.7	1.6	8.1	100

DNA 分别进行体外杂交。每次实验都以大肠埃希氏菌 K12 AS1.365 作对照。结果列于表 3。

表 3 的结果表明: 大肠埃希氏菌 K12 AS 1.365 与嗜热脂肪芽孢杆菌中的任何一株均不表现同源性。18 号菌株与另外 8 株嗜热脂肪芽孢杆菌中的 17 号菌株有 25.1% 的同源性, 与其它 7 株菌只有不超过 5.6% 的同源性。48 号菌株与 44 号菌

株和 52 号菌株分别有 87.2% 和 85.0% 的同源性,与其它菌株只有不超过 8.1% 的同源性。59 号菌株与 51 号菌株有 50.9% 的同源性,与其余菌株只有不超过 11.5% 的同源性。因此,17 号菌株和 18 号菌株形成了亲缘群 I, 48 号、44 号和 52 号菌株形成了亲缘群 II, 而 59 号与 51 号菌株则形成了亲缘群 III。

根据表 3 的同源性%, 亲缘群 I 与亲缘群 II 的平均同源性% 为 4.5%; 亲缘群 II 与亲缘群 III 的平均同源性% 为 7.0%; 亲缘群 I 与亲缘群 III 的平均同源性% 为 1.85%。这些同源性% 均在 10% 以下,它们之间的差异不一定能确切地反映本质问

题。但这三群间的同源性% 似乎也与这三群间的 DNA 中 G + C 克分子% 的差异相一致: 即 G + C 克分子% 差异大的群间,同源性% 则小;反之亦然。亲缘群 I 与 III 的 G + C 克分子% 差异最大,二者之间的同源性% 则最小。亲缘群 I 与 II G + C 克分子% 差异居中,二者的同源性% 也居中。亲缘群 II 与 III 的克分子% 的差异最小,则二者的同源性% 最大。

9 株嗜热脂肪芽孢杆菌 DNA 的 G + C 克分子%, DNA 之间的同源性,它们分别所属的数值分类的表观群,以及它们在表观群中与群内中心株之间的距离可综合于图 1。

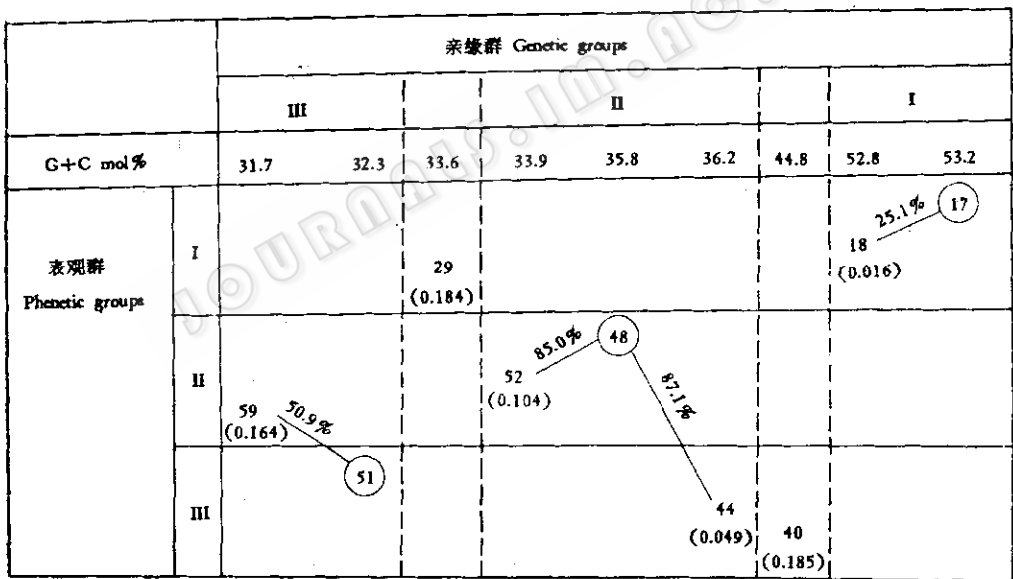


图 1 嗜热脂肪芽孢杆菌的表观群与亲缘群的关系

Fig. 1 The relationship between the phenetic and genetic groups of *Bacillus stearothermophilus*

注: 图中有○的菌株是该表观群的中心株。非中心株菌号下括弧中的数字是该菌株与中心株的距离。用直线相连的菌号表示所形成的亲缘群。直线旁的百分数表示两菌株之间的同源性%。

Note: The central strains are in circles "O". The numbers in brackets under the non-central strains represent their distances to the central strains. The genetic groups are connected with straight lines and the homology percentages are indicated on the lines.

表 4 29 号菌株与其它菌株的同源性%

Table 4 Homology % of strain 29 and other strains

同源% Homology %	测定株 Test strain	AS 1.365	29	40	44	47	48	51	59
参考株 Reference strain	29	0.4	100	0.7	0.4	0.4	0.5	0	0.6

图 1 形象地说明:

1. 三个亲缘群与前文^[4]的三个表观群并不完全吻合, 却与 DNA 的 G + C 克分子%有一定的相关性, 即同属于一个亲缘群的菌株, 其 G + C 克分子%必然相近。但 G + C 克分子%相近的菌株却未必属于同一个亲缘群, 如 29 号菌株与 51 号菌株的 G + C 克分子%虽然相近, 但其同源性却为 0 (表 4)。

2. 数值分类的表观群虽不能很好地反映菌株间的 DNA 同源性%, 但各表观群中的菌株与中心株的距离却与 DNA 的 G + C 克分子%有明显的关系: 与中心株距离远的菌株, 它们的 DNA 中的 G + C 克分子%与中心株的 G + C 克分子%差别也大。例如第 III 表观群中的中心株 51 号与 44 号和 40 号菌株的距离分别为 0.049 和 0.185, 三株菌的 G + C 克分子%分别为 32.3%、36.2% 和 44.8%。其它两个表观群内也表现了类似的情况。

讨 论

1. 芽孢杆菌属内颇有一些种是异源性的。Seki 等^[7]的工作表明, 表观为枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 的菌株可分为三个 DNA-DNA 同源群。Krych 等^[8]的工作表明: 62 株球形芽孢杆菌 (*B. sphaericus*) 形成五个 DNA-DNA 同源群和 12 株不能归群的零散菌株。

2. 嗜热脂肪芽孢杆菌最基本的定义是

在 65℃ 和 pH7 生长良好的芽孢杆菌^[3]。不论其表观特征还是 DNA 特征都表明这个种的异源性。仅就 DNA 中的 G + C 克分子%而论, 《伯杰氏鉴定细菌学手册》^[3] 第八版所列的嗜热脂肪芽孢杆菌 DNA 的 G + C 克分子%为 44—53%, 其幅度为 9%。Sharp 等^[9]所测定的嗜热脂肪芽孢杆菌 DNA 的 G + C 克分子%为 47.5—62.2%, 其幅度为 14.7%。我们测定的 G + C 克分子%为 31.7—53.2%, 幅度为 21.5%。肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) DNA 的 G + C 克分子%为 39—59%, 幅度为 20%, 假单胞菌科 (Pseudomonadaceae) 为 58—70%, 幅度为 12%^[3]。以上的数字表明嗜热脂肪芽孢杆菌的 G + C 克分子%的幅度相当于或大于一个科的幅度。这充分说明仅以 65℃ 和 pH7.0 生长良好的芽孢杆菌为定义所包括的菌株的异源性。

3. Sharp 等^[9]测定 7 株嗜热脂肪芽孢杆菌的 DNA-DNA 的同源性, 其结果列于表 5。

我们的结果与 Sharp 等的结果颇有相似之处: 菌株间的 DNA-DNA 同源性%与 DNA 的 G + C 克分子%有一定的相关性。

4. 17 和 18 号菌株不仅表观特征十分相似, 而且还归于同一亲缘群。但在本文中, 它们的同源性偏低, 这可能是由于 17 号菌株 DNA 的纯度低而造成的。Carolyn 等^[10]在论及 DNA 的纯度时提出变性率的

表 5 嗜热脂肪芽孢杆菌的 DNA-DNA 同源性%

Table 5 DNA-DNA homology of
B. stearothermophilus

菌株号 No. of strain	DNA 中的 G + C 克分子% G + C mol % in DNA	NCA 1503 与其它各 株的 DNA 的同源性 Homology % of NCA 1503 with other strains
NCA 1503	51.9	100
240	52.3	92
10	50.9	85
RS 93	54.5	77
ATCC 12016	54.2	74
262	62.2	28
136	47.5	12

指标。通常增色性反映变性率应为 35% 左右,而 17 号菌株的 DNA 的增色性只有 20% 左右,可能是 DNA 的纯度太低,从而降低了杂交百分数。

5. 40 号菌株的 DNA 的 G + C 克分子含量为 44.8%,与其它 8 株菌的 G + C 克分子 % 有很大的距离。同时以 DNA-DNA 杂交测得与各群菌株的同源性 % 都极低,这就进一步证明它与其它菌株间的亲缘关系也较远。

6. 表 3 和表 4 的数据表明,29 号菌株

和 40 号菌株与现有菌株的 DNA 同源性均很低。我们推测:29 号菌株和 40 号菌株很可能属于另外的两个亲缘群。

7. 本文试验的结果表明,单纯依据表观特征或遗传特征划分种的范围未必是恰当的。Brenner^[11] 的主张,将表观特征和遗传特征结合起来,作为种的定义是可取的。

参 考 文 献

- [1] Smith, N. R. et al.: U. S. Dept. of Agri., Mon. No. 16, 1952.
- [2] Gordon, R. E.: "The genus *Bacillus*", Washington, D. C., 1973.
- [3] Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Baltimore, pp. 529—555, 1974.
- [4] 王大相等:微生物学报, 21: 385—401, 1981.
- [5] 蔡妙英等:微生物学通报, 11: 40—42, 1984.
- [6] 林万明等:微生物学通报, 8: 245—247, 1981.
- [7] Seki, T. et al.: *Int. J. Sys. Bact.*, 25: 258—270, 1975.
- [8] Krych, V. K. et al.: *Int. J. Sys. Bact.*, 30: 467—484, 1980.
- [9] Sharp, R. J.: *Gen. Microb.*, 117: 201—210, 1980.
- [10] Carolyn, H. et al.: *Int. J. Sys. Bact.*, 32: 57—66, 1982.
- [11] Brenner, D. J.: In "The Prokaryotes" Vol. II, ed. by Starr, M. P. et al., New York, p. 1110, 1981.

THE RELATIONSHIP BETWEEN PHENOTYPIC AND GENOTYPIC GROUPS OF *BACILLUS* *STEAROTHERMOPHILUS*

Cai Miaoying Hong Junhua Liu Yutai Wang Da-si

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

The genotypic relationship of three phenons of *Bacillus stearothermophilus* was examined with DNA-DNA hybridization. Three genotypic groups were formed based on DNA homology. The strains of the genotypic groups did not coincide with that of the phenotypic groups, but there were some correlation with the G+C contents in DNA. The G+C contents in DNA of the same genotypic group fell in a narrower range, though the strains with similar G+C contents may not necessarily be in one genotypic group. Central strain distances within a phenon were also correlated with

the G+C contents. If the strains with similar G+C contents to that of their central strain, the central strain distances were also smaller. The result demonstrates that *Bacillus stearothermophilus* is a heterogenous species and supports Brenner's claim that the definition of a species should be based on both phenotypic and genotypic characteristics.

Key words

Bacillus stearothermophilus; Hybridization of DNA; Bacterial taxonomy