

# 链孢囊放线菌及其相关菌的数值分类研究\*

张利平

(河北大学生物系 保定 071002)

陈文新

(中国农业大学生物学院 北京 100094)

阮继生

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要** 对链孢囊菌属的 28 株放线菌和 4 株气丝可形成孢囊的放线菌进行了形态、生理生化特性、生长条件、抗生素敏感性、抗菌谱等 107 项试验测定。根据 Ssm 相似性系数及平均链锁聚类方式,借助于电子计算机对这些菌株进行了比较。结果表明,11 株国际公认的链孢囊菌属的标准菌和一株已知的链孢囊菌与供试未知菌,在 59% 的水平上归为一群。通过数值分类把所比较的菌株在 77% 水平上区分为不同的表观群,为进一步的分子分类学研究和种的鉴定提供了依据。

**关键词** 链孢囊菌属,数值分类

数值分类学通常也称为统计分类学(Taxometrics),它是按等权原则用数值的方法评价有机体之间的相似性或相异性,根据相似值对这些有机体进行分群归类的一种现代生物分类方法。

数值分类是在本世纪 50 年代末随着多变量分析和电子计算机的应用而发展起来的。1956 年英国微生物学家 Sneath 首先将数值分类法用于细菌的分类,此后不少的学者相继采用这种方法开展生物分类的研究,至今数值分类已形成了一整套的理论和技術体系,成为微生物分类学的基本方法之一。在放线菌分类中,数值分类方面的报道多见于链霉菌及其相关属、马杜拉放线菌、拟诺卡氏菌以及分枝杆菌的分类研究<sup>[1-4]</sup>。1988 年阮继生等人,曾报道了关于游动放线菌科和诺卡氏菌科的属级的数值分类的研究。作者采用了数值分类的方法对 16 株已经过形态、细胞壁化学组分、醌、磷酸类脂分析,DNA 的 G+C mol%测定已确定为链孢囊菌属的放线菌<sup>[5]</sup>及 4 株气丝可形成孢囊的相关菌与 11 株链孢囊菌属(*Streptosporangium*)的已知种及 3 株库茨勒菌属(*Kutzneria*)已知种进行比较,根据观测到的结果,计算这些被试菌株之间的相似性,并根据这些相似性把它们归为不同的表观群(种群),为进一步鉴定奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株(OTUS)选择

\* 国家自然科学基金重大资助项目。

本文于 1995 年 5 月 25 日收到。

试验中的未知菌由云南省微生物研究所姜成林、徐丽华等人从云南省不同地区和不同自然环境土壤中分离得到。标准菌株由日本 JMC 提供。菌种编号及来源见表 1。

表 1 被试菌种目录

Table 1 List of test strains

序号	菌株号	来源	序号	菌株号	来源
No.	No. of strains	Source	No.	No. of strains	Source
1	<i>S. violaceochromogenes</i> 3281	JCM*	18	7098	云南
2	<i>K. viridogriseum</i> subsp. <i>viridogriseum</i> 3282	JCM	19	7177	云南
3	<i>K. albidum</i> 3240	JCM	20	7179	云南
4	<i>S. longisporum</i> 3106	JCM	21	7108	云南
5	<i>S. roseum</i> 3005	JCM	22	7136	云南
6	<i>S. vulgare</i> 3028	JCM	23	11005	云南
7	<i>S. nondiasticum</i> 3114	JCM	24	11007	云南
8	<i>S. amethystogenes</i> 3026	JCM	25	15110	云南
9	<i>S. album</i> 3025	JCM	26	15063	云南
10	<i>S. fragile</i> 6242	JCM	27	15064	云南
11	<i>S. pseudovulgare</i> 3115	JCM	28	15106	云南
12	<i>S. viridialbum</i> 3027	JCM	29	14363	云南
13	<i>S. corrugatum</i> 3181	JCM	30	14327	云南
14	<i>K. viridogriseum</i> subsp. <i>kofuense</i> 3157	JCM	31	5866	云南
15	7043	云南	32	15107	云南
16	7113	云南	33	7109	云南
17	7152	云南	34	7161	云南
			35	<i>S. rubroaurantiacum</i>	CCCCM**
				4180	

\* JCM: Japan Collection of Microorganisms

\*\* CCCC: 中国微生物菌种保藏管理委员会 China Committee for Culture Collection of Microorganisms.

1.2 试验性状分析

1.2.1 性状的选择: 参考《伯杰氏细菌系统学手册》第四卷<sup>[6]</sup>关于链孢囊菌属种的鉴定的有关内容, 主要进行了形态结构、培养特征、生理生化特性、碳、氮源利用、生长条件、抗菌活性及对抗生素敏感性等 7 类 167 项试验测定, 除去全同项目, 共 107 项试验结果参加了分析比较。

1.2.2 形态学特征: 菌体大小; 孢囊形状及大小; 孢囊孢子形状及大小; 产生紫色晶体。

1.2.3 培养特征: 在贝奈特琼脂、燕麦粉酵母膏琼脂上基丝、气丝, 可溶性色素的颜色。

1.2.4 生理生化试验: 明胶液化。纤维素利用, 黑色素产生、淀粉水解(有机或无机)、牛乳反应、硝酸盐还原、脲酶试验、V<sub>B</sub> 需求。

1.2.5 碳源利用试验: 草酸钠、琥珀酸钠, 苹果酸钙、粘液酸、尿酸、脲酸钠、柠檬酸钠、甲

葡萄糖、麦芽糖、乳糖、木糖、纤维二糖、阿拉伯糖、蜜二糖、山梨醇、棉子糖、赤藓糖、D-果糖、D-半乳糖、D-甘露糖、山梨糖、甘露醇、肌醇、鼠李糖、糊精。氮源利用:酪蛋白、酪氨酸、腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶、尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤。

**1.2.6 生长条件:** 10℃、42℃ 生长; 3% NaCl 生长。

**1.2.7 对抗生素的敏感性:** 氯洁霉素 20μg/片、氯霉素 30μg/片、头孢呋新 30μg/片、新生霉素 5μg/片、杆菌肽 0.041U/片、氨苄青霉素 10μg/片、羧苄青霉素 100μg/片、头孢哌酮 75μg/片、去甲万古霉素 30μg/片、苯唑青霉素 1μg/片、红霉素 15μg/片。

**1.2.8 抗菌谱:** 对枯草杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、白色假丝酵母、黑曲霉、青霉的抑制作用。

### 1.3 方法

**1.3.1 形态观察:** 采用常规 HV 琼脂平皿插片法, 培养 7~14d 后观察孢囊大小、形状。并经固定脱水后, 用扫描电镜观察孢囊形态。采用透射电子显微镜观察孢囊孢子的形状及大小<sup>[5]</sup>。

**1.3.2 培养特征的观察:** 采用燕麦粉琼脂、燕麦粉酵母膏琼脂、察氏琼脂、葡萄糖天门冬素琼脂、贝奈特琼脂、酵母膏麦芽膏琼脂、无机盐淀粉琼脂、甘油天门冬素琼脂等 8 种培养基, 斜面接种, 28℃ 培养 7~14d 观察, 基丝、气丝、孢囊层及可溶性色素的颜色, 参照《链霉菌鉴定手册》色谱<sup>[7]</sup>。选其中两种参加比较。

**1.3.3 生理生化特性:** 牛乳试验采用乌尔里克牛乳培养基, 有机酸利用采用 Koser<sup>[8]</sup>的方法, 其他常规试验参照《一般细菌鉴定方法》中的方法<sup>[9]</sup>。维生素需求试验参考周俊初等<sup>[10]</sup>所采用的培养基并加以改进, 菌体经液体培养后, 转入含不同 V<sub>B</sub> 和不含 V<sub>B</sub> 的液体培养基中振荡培养。

**1.3.4 抗菌活性及抗生素敏感试验:** 抗生素敏感试验采用常规药敏试验方法, 含抗生素标准药物纸片由中国药品生物制品检定所出品。抗菌谱试验采用常规试验方法, 模型细菌由中国医学微生物菌种保藏管理中心 (CMCC) 提供, 真菌由河北省卫生防疫站提供, 所用菌株均为此项实验所用标准菌号。

### 1.4 实验数据的分析处理

**1.4.1 数据编码:** 在规范条件下进行以上各项特征测定数据, 根据计算机运算程序的要求, 对所取得的各项数据进行编码。测试结果记为两态特征, 阳性记为“+”, 阴性记为“-”, 资料缺少用“NC”表示。删掉测试结果中的全“+”或全“-”的性状特征, “+”、“-”结果分别以“1”“0”的方式输入计算机, 资料缺少输入“N”, 多态特征采用加权编码法。

**1.4.2 相似性系数的计算:** 采用  $S_{sm} = (a+d) / (a+b+c+d-NC)$  公式计算。

**1.4.3 聚类方式:** 采用平均链锁聚类方式 [Average Linkage Clustering (UPGMA)]。

**1.4.4 树状谱:** 本试验树状谱由中国科学院微生物研究所 MINTS 数值分类系统自动生成。

## 2 结果和讨论

试验中的 16 株未知菌, 在气生菌丝上形成球形孢囊, 孢囊孢子不游动, 细胞壁 III/B 型; 磷酸类脂 PIV 型; 甲基萘醌组分 MK-9 (H<sub>0</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>4</sub>); DNA 的 G+C mol 含量为 69%

~71.5%(另见报道)。因此,这 16 株菌可以确定为链孢囊菌属(*Streptosporangium*<sup>[5]</sup>)。进行数值分类研究是先将它们聚类,然后对其进行 DNA-DNA 分子杂交。数值分类的选项参照了国际公认的权威性著作《伯杰氏系统细菌学手册》<sup>[6]</sup>中链孢囊菌属的种的鉴定的标准。这是目前国际上唯一通用的定种参考依据。

35 株试验菌 107 项特征性状的数值分类结果全部都表现在聚类树状谱(图 1)中。所试验的全部菌株在 59%的水平上聚在一起,在 80%的水平上标准菌株 3106 (*Streptosporangium longisporum*)与未知菌株 15064 聚在一起,在 72%的水平上,7043 等 14 株未知菌与 3281 等 7 株已知菌分成明显的两个表观群。其余的标准菌株与未知菌株的相似性均在 72%以下。根据其他放线菌数值分数的有关资料,将 S=77%的水平视为一个种群,35 个试验菌在这一相似水平上可以分为 9 个种群和 4 株各不相同的独立的菌株,即表观群 I 3281 与 3181、表观群 II 3106 与 15064;表观群 III 3028、3026、3025 和 3027;表观群 IV 7043、7152、15064、7136、15110、15107、7108、15106、14363、7161;表观群 V 7098 与 5866;表观群 VI 7113 与 7109;表观群 VII 为 7177、11005、11007、7179;表观群 VIII 3114、3115、3157;表观群 IX 3282 与 3240。在 77%的相似性水平上,14327、6242、4180、3005、表现为 4 个独立存在的菌

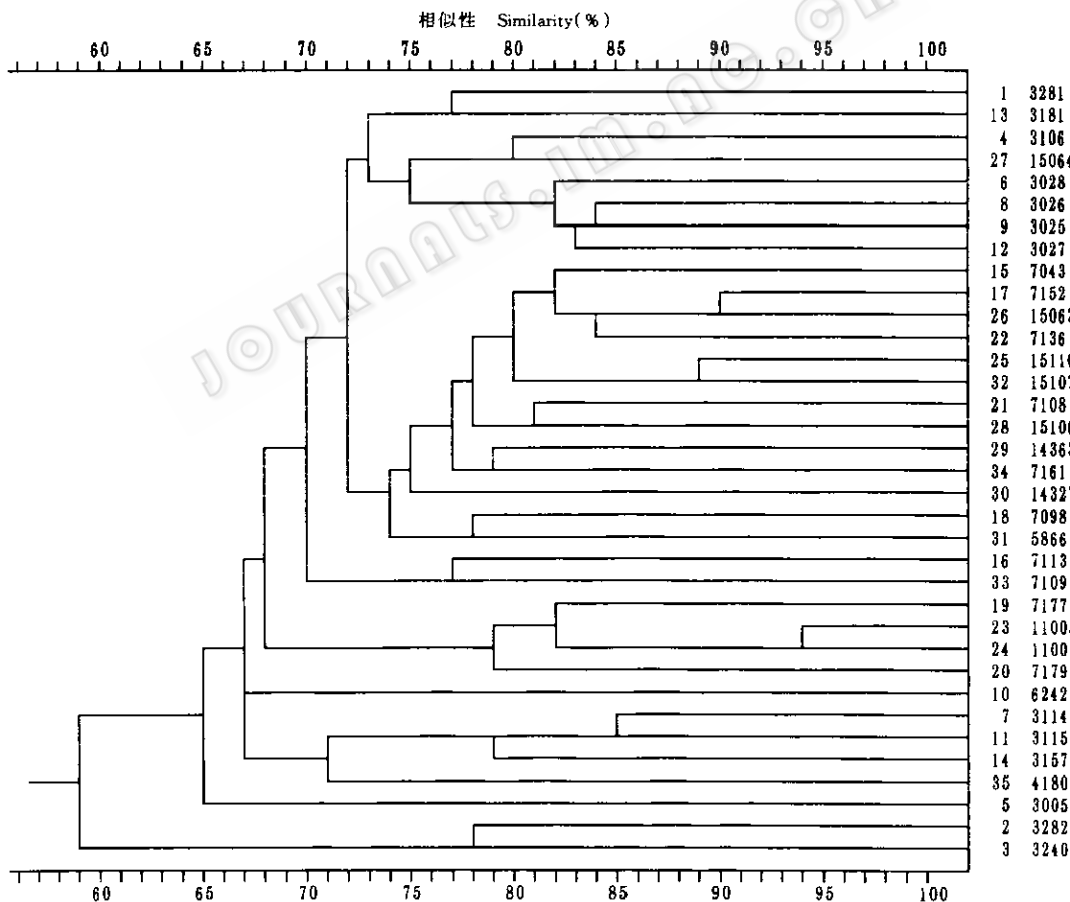


图 1 平均链锁聚类分析树状图

Fig.1 Dendrogram [Average linkage Clustering (UPGMA)]

株(图 1)。

从树状谱的分析结果可以看出,未知菌株与标准菌株的相似平均值较低,从而可看出它们之间所存在的内在的差异。但此结果尚不能完全作为定种的依据。在此实验的基础上,正在进行 DNA-DNA 体外杂交等分子分类学的研究,待完成这些实验内容之后,才能确定所试验的菌株之间的关系。此项研究工作为下步试验提供了参考依据。

本次实验经过两次重复,进行了两次微机数据处理,并与单链锁的聚类方式相比较,在树状谱上均有标准菌株聚集成堆的情况,如 3025、3026、3027、3028 已知菌株在 82% 相似水平上聚在一起,这个相似性则高于与其余的试验菌之间的相似性平均值。出现这个结果的原因可能是因为放线菌分类学的发展是一个历史的过程,一个属的建立和属内成员的增加也是一个历史的过程,所以说定属定种的标准会有一些差异。如已往链孢囊菌属(*Streptosporangium*)定种的依据是:气丝与基丝的颜色,可溶性色素,孢囊与孢囊孢子的特征,硝酸盐还原和淀粉水解的特性等,有些已知种之间往往只是在菌落颜色或一、两项生化特性上存在差异,在所进行的 107 项试验中应更广泛地反应出菌株之间的相似或相异程度。至于这些已知种之间的确切关系,是否有些可合并为同一个种,有待于深入研究。

20 株未知菌种有 16 株已定为链孢囊菌属(*Streptosporangium*),另外 4 株由于其磷酸类脂型与链孢囊菌属的报道有差异,故暂未归属。已知菌株 3282、3157、3240 原属于链孢囊菌属,Stackebrandt E 根据其磷酸类脂和脂肪酸分析的结果,将它们另立为一个新属 *Kutzneria*<sup>[11]</sup>。在本试验中将它们一起进行分析比较,是为了看一下它们在化学分类以外的其他的分类特征上与标准菌及其它未知菌的差异,以便进一步分析鉴定。从分析结果中可以看出,3282 菌株和 3240 菌株相似值达 78%,3157 菌株与 3115 菌株的相似值达到 79%。由此可以看出,数值分类虽不能确定种间的确切关系,但能为分子分类方法提供一些参考依据,以便考察他们之间的 DNA-DNA 同源性。同时也可以看出,表观型相似性较大的菌种之间,存在着较大的化学分类上的差异,而这个差异将有可能以分子生物学方法的分子分类指标得到解决。

**致谢** 微机操作由中国农业大学生物学院微生物系李颖老师协助完成,特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Goodfellow M, Minnikin D E, Todd C et al. *J Gen Microbiol*, 1982, **128** (6): 1283~1297.
- [2] Williams S T, Goodfellow M, Alderson G et al. *J Gen Microbiol*, 1983, **129** (6): 1743~1813.
- [3] Grund E, Kroppenstedt R M. *Int J System Bacteriol*, 1990, **40** (1): 5~11.
- [4] Kampf P, Kroppenstedt D W. *J Gen Microbiol*, 1991, **137** (8): 1831~1891.
- [5] 张利平,阮继生,陈文新.微生物学报,1996, **36** (1): 63~66.
- [6] Hidoe. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 4 Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 1989. 2545~2551.
- [7] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册色谱.北京:科学出版社,1975.
- [8] Koser J. *J Bact*, 1924, **9**: 59~77.
- [9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组.一般细菌常用鉴定方法.北京:科学出版社,1978.
- [10] 周俊初,曹燕珍.华中农学院学报,1981, (3): 44~56.
- [11] Stackebrandt E. *Int J System Bacteriol*, 1994, **44**: 256~269.

## A STUDY ON NUMERICAL CLASSIFICATION OF *STREPTOSPORANGIUM* AND RELATED ACTINOMYCETES

Zhang Liping

(Department of Biologl, Hebei University, Baoding 071002)

Chen Wenxin

(College of Agricultural Biology of China Agricultural University, Beijing 100094)

Ruan Jisheng

(Institute of Microbiology Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** 35 strains in sporangia-forming Actinomycetes were compared with numerical classification using 107 characters. There are 11 type strains and 17 unknown strains belong to *Streptosporangium*, and 3 strains of *Kutzneria* and 4 strains related Actinomycetes. Data were examined using the average linkage clustering (UPGMA). The result by Ssm coefficient showed that nine clusters and four alone strains were obtained at 77% similarity level in dendrogram. Clustering was made the UPGMA analysis with computer TRS.

**Key words** *Streptosporangium*, Numerical classification