

# 白色杆菌属一新种的分离鉴定及其系统发育学分析

刘洪灿 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

横田 明 杉山 纯多

(东京大学分子和细胞生物学研究所 日本)

**提 要** 从热带土壤中分离到一株好氧、革兰氏阳性、不产芽孢的杆状菌株 F-8,该菌株含有 MK-11 为主要醌组份,细胞壁肽聚糖的氨基酸组分为 2,4-氨基丁酸和  $\gamma$ -氨基丁酸等,细胞壁糖组分为鼠李糖、半乳糖和葡萄糖,DNA 的 G+C 含量为 68mol%。16SrRNA 基因测序和系统发育学分析的结果表明,菌株 F-8 与驹形白色杆菌(*Leucobacter komagatae*)亲缘关系最近,其 16S rRNA 基因的同源率为 96%。两者的总 DNA 杂交率为 62%,生理生化特征也有差异,故可把菌株 F-8 定为一个新种,即热带白色杆菌(*Leucobacter tropicalis* sp. nov.)。

**关键词** 热带白色杆菌 系统发育学分析,16S rRNA 基因序列

**分类号** Q939 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)05-0396-01

随着分子生物学向分类学的不断渗入,微生物分类学正在步入一个崭新的阶段,目前,以 16S rRNA 基因序列为主的系统发育学分析,结合化学分类已成为细菌分类学研究中的主流<sup>[1]</sup>。革兰氏阳性、好氧、细胞呈不规则杆状、细胞壁中含有 2,4-氨基丁酸类群细菌,目前包括五个属:棍状杆菌属(*Clavibacter*)、拉氏杆菌属(*Rathayibacter*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、壤球菌属(*Agrococcus*)和白色杆菌属(*Leucobacter*)。这些属之间的区分主要基于它们的醌类组分差异:棍状杆菌属(MK-8)、拉氏杆菌属(MK-10)、壤霉菌属(MK-12)、壤球菌属(MK-11、MK-12)、白色杆菌属(MK-11)。其中白色杆菌属(*Leucobacter*)是由 Takeuchi 等<sup>[2]</sup>建议的革兰氏阳性、高 G+C 比、细胞壁含有二氨基丁酸类群中的一新属,只有一个种。我们在研究热带土壤微生物生态时,分离到一株白色杆菌 F-8,该菌株表现出与该属典型种的明显差异,本文报道该菌株的分类地位,综合形态、生理生化、化学分类特征和 16SrRNA 基因序列分析的结果,建议 F-8 为白色杆菌属一新种,即热带白色杆菌(*Leucobacter tropicalis* sp. nov.)。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株及培养条件

菌株 F-8 分离自热带雨林土壤,标准菌株 *Leucobacter komagatae* IAM 1093 来自东京大学 IAM 保藏中心,在 PY-BHI 培养基上培养。

### 1.2 形态特征

菌体细胞在 PY-BHI 培养基上培养 24 h,用相差显微镜观察活菌体,革兰氏染色,电

子显微镜观察等方法确定细胞形态。

### 1.3 生理和生化试验

生理和生化试验按 Cowan 和 Steel<sup>[3]</sup>手册中描述的方法进行。

### 1.4 化学分类特征试验

**1.4.1 细胞壁氨基酸组份** 细胞壁制备及细胞壁氨基酸制备按 Schleifer 和 Kandler<sup>[4]</sup>描述的方法进行 进一步用 Hitachi model L-8500A HPLC 氨基酸自动分析仪确定氨基酸组份。

细胞壁糖组份 :用纤维素薄层层析法确定。

**1.4.2 全细胞脂肪酸分析** :用 GC-8A 气相色谱仪( Shimadzu )确定。

醌类组份 :由冷冻细胞提取醌类化合物 ,硅胶薄层层析和高压液相色谱法分析醌类。

### 1.5 DNA 中 G+C 含量和 DNA-DNA 杂交

DNA 提取和纯化按 Marmur<sup>[5]</sup>方法。DNA 的 G+C 含量由 HPLC 方法测定<sup>[6]</sup> DNA-DNA 杂交研究采用缺刻平移的方法 ,用  $\alpha$ -P<sup>32</sup>标记 F-8 DNA 作为探针 ,与参照菌的 DNA 进行杂交。

### 1.6 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及测序

两个 PCR 引物分别是 8F :5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1512R :5'-ACG-GCTACCTTGTTACGA-3' ,对应于 *E. coli* 16SrRNA 基因的第 8~27 个碱基和第 1512~1495 个碱基 ,PCR 产物纯化和克隆用 Invitrogen TA Cloning<sup>TM</sup>试剂盒。质粒提取用 QIA-GEN QIAprep Spin plasmid 试剂盒 ,测序反应用 ABIPRISMTM Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒 ,测序用 ABI 373S DNA 自动测序仪测定。

### 1.7 序列数据分析

测定序列与基因库中的已知序列在“ Clustaw ”程序包<sup>[7]</sup>中进行多重序列匹配排列 (Multiple Alignments) 分析 ,最后形成一个多重序列匹配排列阵 ,其中形成的缺口用中性元素填补。进化距离的计算用 PHYLIP 程序包中的 DNAdist 程序<sup>[8]</sup> ,根据“ Kimura 2-parameter ”方式 ,通过序列数据计算“ distance matrix ” ,然后把“ distance matrix ”输入“ Fitch ”程序<sup>[9]</sup>中 ,进行系统进化树估算。各分支点的重复性用 PHYLIP 程序包中的“ Seqboot ”、“ Consense ”程序<sup>[10]</sup>分析 ,重复数为 100。

## 2 结果

### 2.1 形态特征

菌落形态 :菌落圆形 ,表面较粗糙 ,白色。个体形态 :菌株 F-8 为革兰氏染色阳性 ,不运动 ,杆状 ,菌体大小为  $0.2 \sim 0.3 \mu\text{m} \times 1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$  ,电子显微镜观察结果见图 1。

### 2.2 生理生化特征

生理生化特征实验结果见表 1。

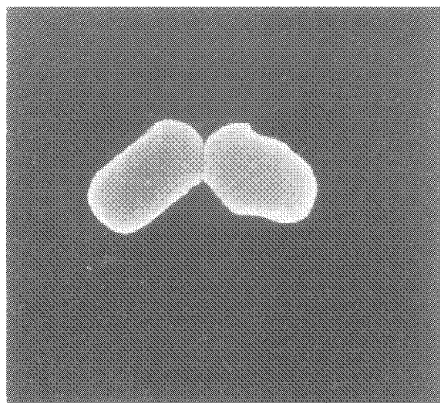


图 1 菌株 F-8 细胞的电子显微镜照片

Fig. 1 The electron micrograph of strain F-8

(12 000 $\times$ )

表 1 菌株 F-8 与 *Leucobacter komagatae* 标准菌的生理生化特征比较

Table 1 Comparisons of physical and biochemical features between isolate F-8 and *L. komagatae*

特征 Characteristic	菌株 Strain	
	<i>L. komagatae</i>	F-8
吐温水解 Tween hydrolysis		
Tween60	+	—
Tween80	+	—
淀粉水解 Starch hydrolysis	—	+
七叶苷水解 Esculin hydrolysis	—	+
脲酶 Urease	+	+
硫化氢产生 H <sub>2</sub> S formation	+	+
吲哚产生 Indole formation	—	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	—	+
V. P. 反应 V. P. reaction	—	—
甲基红试验 Methyl red test	+	—
在 5% NaCl 中生长 Growth in NaCl	+	—
利用有机酸 Assimilation of organic acid		
乙酸 Acetate	+	—
柠檬酸 Citrate	—	+
乳酸 Lactate	+	—
琥珀酸 Succinate	+	—
草酸 Oxadate	+	—
马尿酸 Hippurate	+	—
醌系 Quinone system	MK-11	MK-11
细胞壁氨基酸 Cell wall diamino acid	A2bu	A2bu
细胞壁糖组分 Cell wall sugar	Galactose glucose	Rhamnose glucose galactose
全细胞脂肪酸 Cellular fatty acid	anteiso-C <sub>15</sub> :0 anteiso-C <sub>17</sub> :0	anteiso-C <sub>15</sub> :0 anteiso-C <sub>17</sub> :0
G + C content/(mol% )	66.2	68

2.3 化学分类特征

菌株 F-8 细胞壁肽聚糖的氨基酸成分为丙氨酸、谷氨酸、2-氨基丁酸和甘氨酸(摩尔比 1.66 : 1 : 0.77 : 0.95 ) 及特征性的  $\gamma$ -氨基丁酸。细胞壁肽聚糖的糖组份为鼠李糖、半乳糖和葡萄糖。甲基醌的主要组份为 MK-11 和少量的 MK-10。全细胞脂肪酸的组份为 anteiso-C<sub>15</sub>:0 , iso-C<sub>16</sub>:0 and anteiso-C<sub>17</sub>:0。

2.4 DNA 中 G + C 含量和 DNA-DNA 杂交

菌株 F-8 基因组的 DNA 中的 G + C 含量为 68mol%。与标准菌株 *Leucobacter komagatae* 的 DNA 杂交率为 62% , 据此可把二者区分为不同的种。

2.5 系统发育学分析

用引物 8F 和 1512R 扩增菌株 F-8 的 16S rRNA 基因 , 共 1448 个碱基 , 其序列见图 2。将该序列送入 RDP 数据库进行相似性分析 , 结果表明 , 菌株 F-8 归入革兰氏阳性、高 G + C 比、细胞壁中含有氨基丁酸细菌类群 , 与 *Leucobacter* 属的相似性最高。把该序列与革兰氏阳性、高 G + C 比、细胞壁中含有氨基丁酸细菌类群的 16S rDNA 序列进行系统发育学分析 , 结果如图 3 所示。

AGAGTTTGAT	CCTGGCTCAG	GACGAACGTT	GGCGGCGTGC	TTAACACATG	CAAGTCGAAC
GATGAAGCCC	AGCTTGCTGG	TGGAAGAGTG	GCGAACGGGT	GAGTAACACG	TGAGTAACCT
GCCCTGAACT	CTGGGATAAG	CACTGGAAAC	GGTGTCTAAT	ACTGGATACG	ACCTATCACC
GCATGGTGTG	TGGGTGGAAG	GATTTATCGG	TTTTGGATGG	ACTCGCGGCC	TATCAGCTAG
ATGGTGAGGT	AATGGCTCAC	CATGGCGACG	ACGGGTAGCC	GGCCTGAGAG	GGTGACCGGC
CACACTGGGA	CTGAGACACG	GCCCAGACTC	CTACGGGAGG	CAGCAGTGGG	GAATATTGCA
CAATGGGCGC	AAGCTGATGC	AGCAACGCCG	CGTGAGGGAT	GACTGCCTTC	GGGTTGTAA
CCTCTTTTAG	TAGGGAAGAA	GCGAGAGTGA	CGGTACCTCC	AGAAAAAGCA	CCGGCTAACT
ACGTGCCAGC	AGCCGCGGTA	ATACGTAGGG	TGCAAGCGTT	GTCCGGAATT	ATTGGGCGTA
AAGAGCTCGT	AGGCGGCTTG	TCGCGTCTGC	TGTGAAATCC	CGGGGCTCAA	CCCCGGGCCT
GCACTGGGTA	CGGGCAAGCT	AAAGTGCGGT	AGGGGAGATT	GGAATTCTCTG	GTGTAGCGGT
GGAAATGCGCA	TATATCAGGA	GGAACACCGA	TGGCGAAGGC	ATATCTCTGG	GCCGCTACTG
ACGCTGAGGA	GCGAAAGCAT	GGGGAGCGAA	CAGGGTTAGA	TACCCTGGTA	GTCCATGCCG
TAAACGTTGG	GAAGTAGATG	TAGGGCCTGT	TCCACGTGGT	TCTGTGTCCT	ACTAACGCAT
TAAGTTCCCC	GCCTGGGGAG	TACGGCCGCA	AGGCTAAAAC	TCAAAGGAAT	TGACGGGGGC
CCGCACAAGC	GGCGGAGCAT	GCGGATTAAT	TCGATGCAAC	GCGAAGAACC	TTACCAAGGC
TTGACATAAC	CGAGAACGGG	CGAGAGATCG	TCAACTCTTT	GGACACTCGG	TTACAGGTGG
TGCATGGTTG	TCGTCAGCTC	GTGTCGTGAG	ATGTTTCGGT	AAGTCCGGCA	ACGAGCGCAA
CCCTCGTCCT	ATGTTGCCAG	CACGTTATGG	TGGGAACTCA	TGGGATACTG	CCGTGGTCAA
CACGGAGGAA	GGTGGGGATG	ACGTCAAATC	ATCATGCCCC	TTATGTCTTG	GGCTTCACGC
ATGCTACAAT	GGCCGATACA	AAGGGCTGCG	ATACCGCGAG	GTGGAGCGAA	TCCCCAAAAG
TCGTCTCAG	TTCGGATTGG	GGTCTGCAAC	TCGACCCCAT	GAAGTCGGAG	TCGCTAGTAG
TCGCAGATCA	GCAACGCTGC	GGTGAATACG	TTCCCGGGCC	TTGTACACAC	CGCCCGTCAA
GTCATGAAAG	TCGATAACAC	CCGAAGCCGG	TGGCCTAACC	CTTGTGGAGG	GAGCTCTCGA
AGGTGGGACT	GGTGATTAGG	ACTAAGTCGT	AACAAGGTAG	CCGT	

图 2 菌株 F-8 的 16S rRNA 基因序列  
Fig. 2 The 16S rRNA gene sequences of isolate F-8

菌株 F-8 与 *Leucobacter komagatae* 聚为一群 ,二者的相似率为 96 % ,进化距离为 0.0910。从系统树上也可明显看到 ,F-8 与 *L. komagatae* 聚成分支的 Bootstrap 值为 100 % ,说明这一分支是可靠的。结合化学分类指标的结果 ,如主要醌类为 MK-11 ,细胞壁含有  $\gamma$ -氨基丁酸 ,据此 ,可把 F-8 归入 *Leucobacter* 属。

3 讨论

菌株 F-8 的表型特征、化学分类特征及遗传特征均符合 *Leucobacter* 属的特征 :细胞

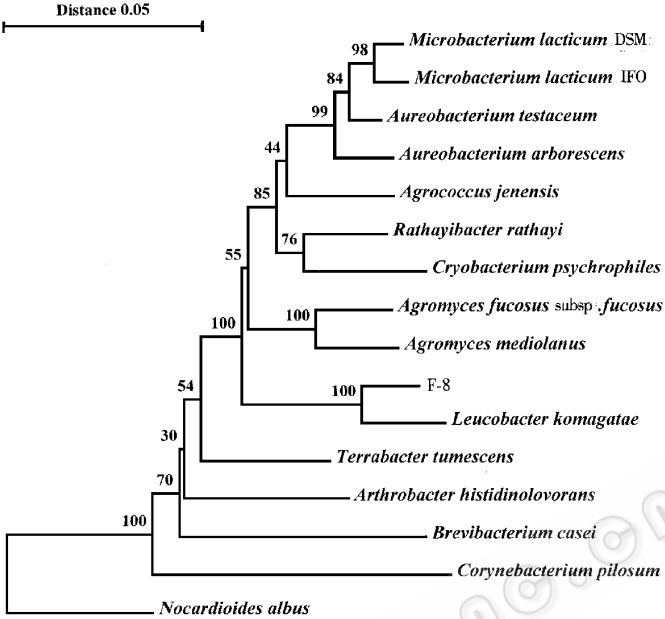


图 3 菌株 F-8 的系统发育学地位

Fig. 3 The phylogenetic position of isolate F-8

杆状,革兰氏染色阳性,醌类组成以 MK-11 为主,细胞壁含有  $\gamma$ -氨基丁酸。依据 16S rRNA 基因序列的系统发育分析,与 *L. komagatae* 形成一组,但菌株 F-8 又与该属的一个已知种 *L. komagatae* 有明显区别(见表 1)。前者可水解 Tween,在 5% NaCl 中生长,后者不能;后者可利用乙酸、富马酸、琥珀酸、草酸和马尿酸,前者不能。二者的分离地点也不同,前者分离自污染的安瓿管,而后者是从热带土壤分离得到的。二者的 16S rRNA 基因序列相似率为 96%,和 DNA-DNA 杂交率为 62%,该结果更说明它们应是不同的种。据此,建议菌株 F-8 为 *Leucobacter* 属的一个新种,定名为热带白色杆菌(*Leucobacter tropicalis* sp. nov.)。

热带白色杆菌(*Leucobacter tropicalis* sp. nov.) 种的描述:革兰氏阳性,细胞呈不规则杆状,细胞大小宽为  $0.2\sim 0.3\mu\text{m}$ ,长为  $1.0\sim 1.5\mu\text{m}$ ,在 PY-BHI 培养基生长 2d,细胞不形成芽胞、不运动、不形成菌丝,菌落白色、圆形、松软,过氧化氢酶阳性,氧化酶阴性,硝酸盐还原性,吲哚产生、 $\text{H}_2\text{S}$  形成阳性,可在 pH10 生长。细胞壁肽聚糖的氨基酸成分为丙氨酸、谷氨酸、2-氨基丁酸、甘氨酸,它们之间的摩尔比是  $1.66:1:0.77:0.95$ ,及特征性的  $\gamma$ -氨基丁酸。细胞壁肽聚糖的糖组份为鼠李糖、半乳糖和葡萄糖。甲基醌的主要组份为 MK-11 和少量的 MK-10。全细胞脂肪酸的组份为 anteiso- $\text{C}_{15}:0$ , iso- $\text{C}_{16}:0$  和 anteiso- $\text{C}_{17}:0$ ,DNA 的 G+C 比为 68mol%,模式菌株 F-8 从热带土壤中分离得到。

致谢 Vallapa 和 Poonsook 博士协助采集土样,特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] Woese C R. *Microbial Rev* ,1989 **51**(2) 221~227.
- [2] Takeuchi K ,Weiss N ,Schumann P *et al.* *Int J Syst Bacteriol* ,1996 **46** 967~971.
- [3] Barrow G I ,Feltham R K A. Cowan and Steel 's Manual for the identification of medical bacteria. Third Edition. London :Cambridge University press ,1993.
- [4] Schleifer K H ,Kandler O. *Bacteriol Rev* ,1972 **36** 407~477.
- [5] Marmur J ,Doty P. *J Mol Biol* ,1962 **5** :109~118.
- [6] Mesbash M ,Premachandran U ,Whitman W B. *Int J Syst Bacteriol* ,1989 **38** :159~167.
- [7] Thompson J D ,Higgins D G ,Gibson T J. *Nucl Acids Res* ,1994 **22** 4673~4680.
- [8] Saitou N ,Nei M. *Mol Biol Evol* ,1987 **4** 406~425.
- [9] Fitch W M ,Margoliash E. *Science* ,1967 **155** 279~284.
- [10] Margush T ,Mcmonis F R. *Bulletin of Mathematical Biology* ,1981 **43** 239~244.

## CHARACTERIZATION AND PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE NEW SPECIES OF THE *LEUCOBACTER TROPICALIS* SP. NOV.

Liu Hongcan Zhou Peijin

( *Institute of Microbiology ,The Chinese Academy of Sciences Beijing 100080* )

Akira Yokota Junta Sugiyama

( *Institute of Cell and Molecular Biology ,The University of Tokyo ,Japan* )

**Abstract** A new aerobic gram-positive non-sporulating rod-shaped organism is described. Strain F-8 was isolated from tropical soil and has the following characteristics :the menaquinone contains a side chain with 11 isoprenyl units( MK-11 ) ,2 4-diaminobutyric acid ,glutamic acid ,alanine ,glycine and a small amount of  $\gamma$ -aminobutyric acid present in the cell wall at a molar ratio of 0.77 : 1.0 : 1.66 : 0.95. The major cellular sugar were rhamnose ,galactose and glucose. The G + C content of DNA is 68mol% . The 16S rRNA gene was amplified ,cloned and sequenced ,a phylogenetic tree was constructed on the 16S rRNA gene sequences. The tree clearly indicated that strain F-8 forming the same lineage with *leucobacter komagatae* ,the level of binary sequence similarity between stain F-8 and *L. komagatae* is 96% . Based on the characteristics ,allow the placement of strain F-8 into the genus *Leucobacter* ,but F-8 showed some differences in biochemical and physical characters from the reported species *L. komagatae* . A new species name ,***Leucobacter tropicalis*** sp. nov. was proposed for this isolate. The type strain is designated F-8.

**Key words** *Leucobacter tropicalis* ,phylogeny ,16S rRNA sequences