

## 云南酸性土壤中嗜酸链霉菌的多样性

徐春光<sup>1,2</sup>, 梁秀梅<sup>2</sup>, 黄英<sup>1\*</sup>, 王黎明<sup>1</sup>, 崔庆峰<sup>1</sup>

<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101)

<sup>2</sup>呼伦贝尔学院生命科学与化学学院, 呼伦贝尔 021008)

**摘要:**【目的】了解酸性土壤环境里中度嗜酸链霉菌的多样性, 调查其物种资源。【方法】用分散和差速离心法及选择性分离培养基从 14 份云南酸性土壤样品中分离到 367 株具有链霉菌培养特征的放线菌, 并进行了颜色分群。从各颜色类群中选取代表菌株共 97 株, 通过显微形态观察和 pH 梯度生长实验确定其中的中度嗜酸链霉菌。进一步从中筛选出 16 株中度嗜酸链霉菌代表菌株, 进行 16S rRNA 基因序列的相似性和系统发育分析, 并结合基因组 DNA-DNA 相关性数据。【结果】分离菌株归为 12 同的颜色类群, 其中 80% 属于中度嗜酸链霉菌, 其代表菌株在系统发育树上形成了 8 个距离较远且与已知种不同的进化分枝, 可能代表链霉菌属内至少 8 个不同的新基因种。【结论】用以上方法筛选出的中度嗜酸链霉菌可归为 8 个不同于已知种的进化群, 说明云南酸性土壤含有丰富多样的中度嗜酸链霉菌新物种。

**关键词:** 中度嗜酸链霉菌; 16S rRNA 基因; 系统发育分析; 多样性; 进化群

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0421-05

在酸性和偏酸性自然环境特别是土壤中, 中度嗜酸放线菌(pH 生长范围 4.5~7.5, 最适 pH5.0~5.5)的数量远远超过严格嗜酸放线菌(pH 生长范围 3.5~6.5, 最适 pH4.5), 而链霉菌是其中的绝对优势菌群, 人们推断中度嗜酸链霉菌在酸性土壤有机物质的降解和转化过程中扮演着重要角色<sup>[1~4]</sup>。近年来国内外的研究<sup>[4, 5]</sup>表明, 酸性土壤中嗜酸稀有放线菌具有较丰富的种属多样性。而对酸性环境中常见放线菌—链霉菌多样性的研究, 更有可能发现新的抗真菌活性物质和在低 pH 下有高活性的酶类, 并且对阐明它们的生态作用具有普遍意义<sup>[6, 7]</sup>。

1991 年, Park 等<sup>[8]</sup>用 5S rRNA 基因序列对专性嗜酸链霉菌、中度嗜酸链霉菌和嗜中性链霉菌进行了系统发育学研究, 发现它们分别在进化树上形成独立分枝。2003 年, Kim 等<sup>[9]</sup>利用分散和差速离心法从酸性土壤中分离到 3 株专性嗜酸链霉菌, 并建立了链嗜

酸菌新属(*Streptacidiphilus* gen. nov.)。2004 年, Kim 等<sup>[10]</sup>对一群中度嗜酸链霉菌的代表菌株 KCTC 9926<sup>T</sup>进行了多相分类研究, 发现此菌株在链霉菌属内形成一个单独的分枝, 并将它所代表的菌群定为链霉菌属的一个新种(*Streptomyces yeochonensis* sp. nov.)。我们从云南酸性土壤中分离纯化到一批嗜酸链霉菌, 通过表型特征和分子系统学分析, 对其中的中度嗜酸链霉菌的物种多样性进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 土壤样品: 表 1 为样品来源及性质。

1.1.2 培养基: 选择分离培养基参照文献<sup>[11]</sup>, 燕麦和 Bennett's 培养基参照文献<sup>[4]</sup>。

1.1.3 主要试剂和仪器: PCR 试剂购自申能博采公司; 引物由上海 Sangon 公司合成; 其余试剂均为国

基金项目: 国家自然科学基金(30770002); 国家“973 项目”(2004CB719601)

\*通讯作者。Tel/Fax: +86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn

作者简介: 徐春光(1978-), 女, 内蒙古呼伦贝尔人, 呼伦贝尔学院生命科学与化学学院助教, 主要从事放线菌系统分类学研究。

收稿日期: 2007-10-29; 修回日期: 2008-01-03

表 1 土样来源和酸度

Sample	Location and vegetation	pH
1	The evergreen broadleaf forest in Diaocen Mountain, Yunnan Province	6.6
2	The mixed forest in Diaocen Mountain, Yunnan Province	6.2
3	The pine forest, Chuxiong, Yunnan Province	5.8
4	The evergreen broadleaf forest in Diaocen Mountain, Yunnan Province	5.3
5	The evergreen broadleaf forest in Zhongshan of Diaocen Mountain, Yunnan Province	5.6
6	The pine forest, Yanglin, Yunnan Province	6.2
7	The pine forest in Dashao of Guandu, Yunnan Province	6.5
8	The evergreen broadleaf forest in Diaocen Mountain, Yunnan Province	6.3
9	The mixed forest in Diaocen Mountain, Yunnan Province	5.1
10	The pine forest, Zixi Mountain, Yunnan Province	6.0
11	The evergreen broadleaf forest in Diaocen Mountain, Yunnan Province	6.3
12	The evergreen broadleaf forest in Zhongshan of Diaocen Mountain, Yunnan Province	5.4
13	The pine forest, Yanglin, Yunnan Province	6.4
14	The pine forest in Dashao of Guandu, Yunnan Province	6.4

产或进口分析纯; PCR 仪器为美国 Bio-rad(MJ)公司产品; 显微镜为德国 Zeiss 公司产品。

## 1.2 中度嗜酸链霉菌的分离、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<sup>[11]</sup>。将所得的单菌落挑至酸性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 °C 保藏。

## 1.3 pH 梯度生长试验

用 pH 3.5~7.5 的缓冲液配制的燕麦培养基, 参照文献<sup>[11]</sup>所述方法进行。根据菌落大小, 基丝、气丝和孢子丝的丰茂程度判断菌株的生长情况。

## 1.4 培养特征和形态观察

用燕麦培养基, 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 基因组 DNA 的小量提取和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增

用 pH 5.0~5.5 的 Bennett's 液体培养基摇瓶培养收集菌体。参照 Chun 等<sup>[12]</sup>报道的方法进行总 DNA 的小量提取和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增, 扩增引物为通用引物 27f 和 1492r。

## 1.6 16S rRNA 基因测序和序列分析

测序引物为通用引物 27f、1115r 和 1492r, 测序

工作由上海联合基因公司完成。将所测序列与 GenBank 数据库中的已有序列进行 BLAST 比对, 并从数据库获得相关种的 16S rRNA 基因序列, 构建系统发育树。序列对比使用 CLUSTAL X1.8 软件<sup>[13]</sup>, 进化距离的计算按照 Kimura<sup>[14]</sup>的方法。进化树的构建用 PHYLIP program package 3.5c<sup>[15]</sup>中的 neighbour-joining<sup>[16]</sup>和 maximum-parsimony<sup>[17]</sup>方法进行。进化树分枝模式的稳定性用 SEQBOOT 和 CONSENSE 程序进行 bootstrap 分析<sup>[18]</sup>, 重复次数为 1000。

## 2 结果

### 2.1 分离菌株的形态特征

从 14 份土壤样品中共分离到 367 株具有链霉菌培养特征的放线菌, 根据基丝、气丝和可溶性色素的特征初步归为 12 个不同的颜色类群: 白孢类群、淡紫灰类群、粉红孢类群、弗氏类群、黄色类群、灰褐类群、灰红紫类群、金色类群、烟灰类群、绿色类群、球孢类群和吸水类群。从中挑取代表菌株 97 株, 显微形态观察表明, 它们的气生菌丝可分别分化出直、直或波曲、波曲和螺旋四种形态特征的孢子丝(图 1), 符合链霉菌的形态特征。

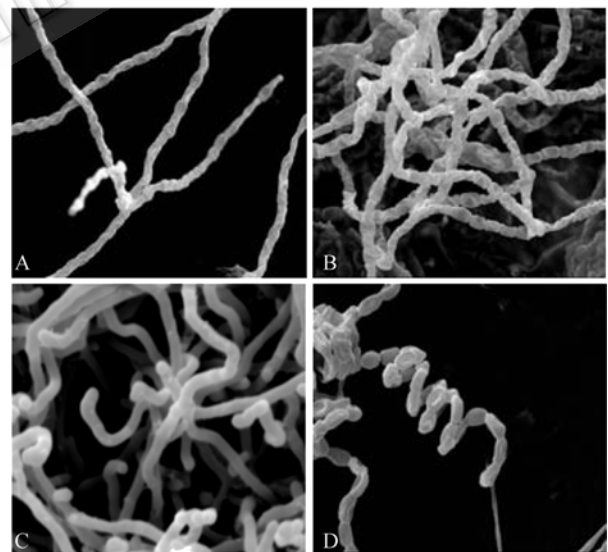


图 1 实验菌株的 4 孢子丝形态特征

Fig. 1 Electron microscope photographs showing four types of spore chain morphological features of tested strains. The morphology was established by examining gold-coated dehydrated specimens using a FEI QUANTA electron microscope. A: straight chains (8000 $\times$ ); B: straight to flexuous chains (8000 $\times$ ); C: flexuous chains (8000 $\times$ ); D: spiral chains (10000 $\times$ ).

### 2.2 pH 梯度生长实验

97 株代表菌株在不同 pH 的燕麦培养基上 28 °C 培养 3 周后, 有 15 株菌在 pH7.5 生长旺盛, 而在 pH4.5~5.5 生

长稍弱, 在 pH3.5 不生长, 它们为耐酸链霉菌; 有 4 株菌在 pH3.5 明显生长, 而在 pH7.5 不生长, 最适 pH 为 4.5, 它们为严格嗜酸链霉菌; 其余 78 株菌(80%)均在 pH7.5 生长较弱或不生长, 在 pH3.5 也不生长, 但在 pH5.0~5.5 生长良好, 符合中度嗜酸链霉菌的 pH 生长范围。根据 pH 梯度生长范围和形态特征, 确定了 16 株中度嗜酸链

霉菌代表菌株, 菌株编号为: 123、126、132、134、136、145、405、317、157、701、926、913、919、1307、1413 和 13c15, 它们分属于 7 个不同颜色类群 (表 2)。

### 2.3 16S rRNA 基因序列分析

测定了这 16 株代表菌株近的 16S rRNA 全基因序列, 并提交 GenBank 进行注册, 各序列的注册号详见图 2。

表 2 16 株中度嗜酸链霉菌代表菌株的颜色类群和培养特征

Table 2 Color groups and cultural characteristics of the 16 neutrotolerant acidophilic streptomycete representatives

Strain number	Color group	Aerial spore mass	Substrate mycelium	Diffusile pigments
157, 701, 913, 919, 1413	Greyish brown	Light grey or grey	Brown or greyish brown	None or light brown
126, 132, 134	Cinereous	Grey	Not distinct or grey	None
317, 1307	Golden	Whitish Grey	Bright yellow to greyish yellow	None or light yellow
123, 926	White	White	Pink or flesh colored	None
136, 145	Yellow	Light yellow	Cream colored	None
405	Light purplish grey	Light purple to grey	Grey	Light purple
13c15	Greyish redish purple	Sparse, grey	Mahogany	Brownish purple

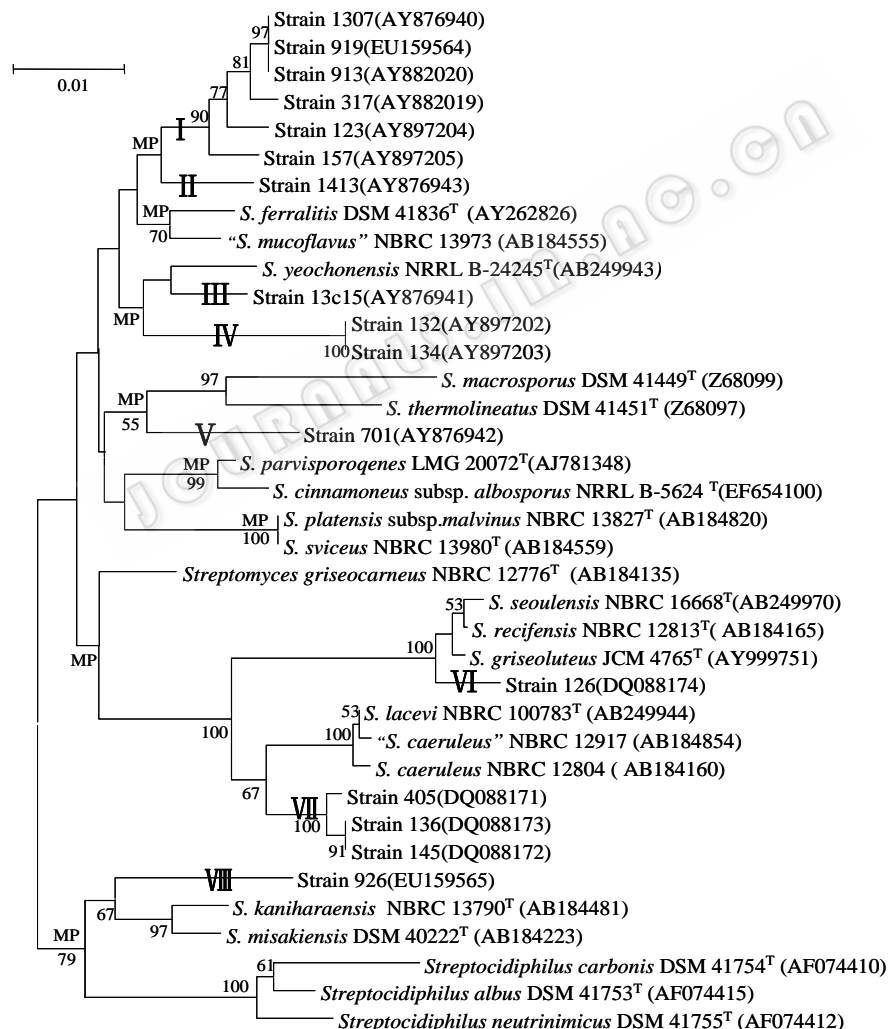


图 2 实验菌株及相关链霉菌的 16S rRNA 基因系统发育树

Fig. 2 Neighbour-joining tree based on almost complete 16S rRNA gene sequences showing the positions of representative isolates. The MP indicates branches that were recovered using the maximum-parsimony tree-making algorithm. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1000 resampled data sets; only values above 50 % are given. The scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position.

将这 16 株代表菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库的已知序列进行比对分析, 结果表明它们均属于链霉菌属。图 2 显示了实验菌株及相关已知链霉菌的 16S rRNA 基因系统发育分析结果。根据 16S rRNA 基因的相似性与系统发育关系, 本研究中的 16 株中度嗜酸链霉菌代表菌株共构成 8 个距离较远且与已知种不同的进化分枝, 代表 8 个不同的进化类群: (1) 菌株 1307、919、913、317、123、157 代表群 I, 分别来自于颜色类群的金色类群、灰褐类群和白色类群; (2) 菌株 132 和 134 代表群 IV, 均来自于灰灰类群; (3) 菌株 405、136 和 145 代表群 VII, 分别来自于淡紫灰类群和黄色类群; (4) 菌株 1413、13c15、701、126 和 926 分别形成单独的进化枝, 各自代表群 II、群 III、群 V、群 VI 和群 VIII。

每个进化群内各菌株之间的 16S rRNA 基因序列相似性很高: 群 I 内各菌株之间的 16S rRNA 基因序列相似性为 99.4%~99.9%; 群 II 内菌株 132 与 134 之间的序列相似性为 99.8%; 群 III 内的序列相似性为 99.7%~99.9%。各群内如此高的 16S rRNA 基因序列相似性提示每个群内的菌株亲缘关系非常近, 有可能属于同一个种。

各群之间的亲缘关系各有远近, 16S rRNA 基因序列相似性从 94.8 到 98.8% 不等。其中群 II、群 III 和群 IV 的菌株间的关系较近, 16S rRNA 基因序列相似性为 97.5%~98.8%, 群 V 和群 VI 构成结构较紧密的上一级分枝; 群 VII 和群 VIII 之间以及它们与其它各群之间的关系稍远, 16S rRNA 基因序列相似性小于 97.8%; 群 II、群 III 和群 IV 之间以及它们与其它各群之间的关系明显松散, 16S rRNA 基因序列相似性均小于 96.0%。从各群的 16S rRNA 基因序列相似性及它们在系统发育上的位置来看, 群 II ~ VIII 应分别属于链霉菌属的不同种。

### 3 讨论

根据表型特征和 pH 梯度生长实验结果, 云南的偏酸性土壤存在着大量的中度嗜酸链霉菌, 它们的形态特征丰富多样; 根据 16S rRNA 基因序列分析的结果, 这些菌株分散在链霉菌属内, 形成多个与已知种不同的进化群, 物种多样性亦很丰富。已有的基因组 DNA-DNA 体外分子杂交证据<sup>[19]</sup>表明, 菌株 1307、1413、13c15 和 701 所代表的关系较近的群 II、群 III、群 V 和群 VI 至少应属于四个独立的新基因种, 支持我们将这 16 株中度嗜酸链霉菌代表菌株归为至少 8 个不同的基因种。由多个代表菌株构成的群 II、群

和群 III 内的菌株之间的 16S rRNA 基因序列相似性均高于 99%, 这三群内的菌株是否分别属于同一基因种, 还需进一步的基因组 DNA-DNA 杂交证据。

群 II、群 III、群 V 和群 VI 中的菌株均与第一个发表的中度嗜酸链霉菌 *S. yeochonensis*<sup>[10]</sup> 聚在一个大的进化分枝上, 这个进化分枝可能代表了链霉菌属中一个主要的中度嗜酸大类群, 涵盖了多个种, 具有较高的物种多样性。

此外, 在群 II 中, 有来自 9 号、13 号、3 号和 1 号土样的分离菌株, 群 III 来自 14 号土样, 群 V 来自 13 号土样, 群 VI 来自 1 号土样, 群 VII 来自 7 号土样, 群 VIII 来自 1 号土样, 在群 VII 中有来自 1 号和 4 号土样的分离菌株, 群 VIII 来自 9 号土样。这说明中度嗜酸链霉菌在所采集土样的地区是广泛分布着的, 不是个别存在的偶然现象, 它们是作为多个不同的进化群客观存在、丰富生长着的, 只是长期以来为人们所忽略; 在同一份土样中, 往往又存在着不止一个进化群的中度嗜酸链霉菌, 说明即使在同一处采样地点, 中度嗜酸链霉菌也存在着物种多样性。这类放线菌可为开发抗真菌活性物质和耐/嗜酸降解酶类提供丰富的新物种资源。

致谢 感谢云南大学微生物研究所对土壤样品采集的大力协助。

### 参 考 文 献

- [1] Khan MR, Willams ST. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. . Distribution and characteristics of acidophilic actinomycetes. *Soil Biol Biochem* 1975, 7: 345-348.
- [2] Williams ST, Robinson CS. The role of Streptomyces in decomposition of chitin in acidic soils. *J Gen Microbiol*, 1981, 127: 55-63.
- [3] Seong CN, Goodfellow M, Ward AC, et al. Numerical classification of acidophilic actinomycetes isolated from acid soil in Korea. *Kor J Microbiol*, 1993, 31: 355-363.
- [4] 崔庆峰, 王黎明, 刘志恒, 等. 酸性土壤中嗜酸稀有放线菌的多样性研究. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2004, 44: 571-575.
- [5] Busti E, Cavaletti L, Monciardini P, et al. *Catenulispora acidiphila* gen. nov., sp. nov., a novel, mycelium-forming actinomycete, and proposal of *Catenulisporaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56: 1741-1746.
- [6] Zakaliukina IuV, Zenova GM. Antagonistic activity of soil acidophilic actinomycetes. *Izv Akad Nauk Ser Biol* (in Russian), 2007, (4): 402-405.
- [7] Bok SH, Seidman M, Wopat PW. Selective isolation of acidophilic *Streptomyces* strains for glucose isomerase production. *Appl Environ Microbiol*, 1984, 47: 1213-1215.

- [8] Park YH, Yim DG, Kim E, *et al.* Classification of acidophilic, neutrotolerant and neutrophilic streptomycetes by nucleotide sequencing of 5S ribosomal RNA. *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 2265–2269.
- [9] Kim SB, Lonsdale J, Seong CN, *et al.* *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici(1943)AL) emend. *Antoni van Leeuwenhoek*, 2003, 83: 107–116.
- [10] Kim SB, Seong CN, Jeon SJ, *et al.* Taxonomic study on neutrotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54: 211–214.
- [11] 王黎明, 黄英, 崔庆峰, 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 (Microbiology)*, 2003, 30: 104–106.
- [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 JD, Gibson TJ, 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] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, 16: 111–120.
- [15] Felsenstein J. PHYLIP (phylogeny inference package) version 3.5 c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1993.
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 406–425.
- [17] Fitch WM. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Zool*, 1971, 20: 406–416.
- [18] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39: 783–791.
- [19] Xu C, Wang L, Cui Q, *et al.* Neutrotolerant acidophilic *Streptomyces* species isolated from acidic soils in China: *Streptomyces guanduensis* sp. nov., *Streptomyces paucisporeus* sp. nov., *Streptomyces rubidus* sp. nov. and *Streptomyces yanglinensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56: 1109–1115.

## Diversity of neutrotolerant acidophilic streptomycetes isolated from acidic soils in Yunnan Province

Chunguang Xu<sup>1,2</sup>, Xiumei Liang<sup>2</sup>, Ying Huang<sup>1\*</sup>, Liming Wang<sup>1</sup>, Qingfeng Cui<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

<sup>(2)</sup> Life Science & Chemistry School, Hulunbuir College, Hulunbuir 021008, China)

**Abstract:** [Objective] Acidophilic filamentous actinomycetes are active in the turnover of organic matter in acid litters and soils, and are a source of antifungal antibiotics and acid-stable enzymes. The aim of this study is to delineate the diversity of neutrotolerant acidophilic streptomycetes in acidic soil environment, and to investigate the resources of species. [Methods] 367 actinomycetes with cultural characteristics of streptomycetes were isolated from 14 acidic soil samples collected in Yunnan Province, China, using the method of DDC (dispersion and differential centrifugation) and a selective medium. The isolates were color grouped on the basis of their properties of aerial mycelium, substrate mycelium and diffusible pigments. 97 representative isolates were picked from the color groups for micromorphological observation and for the test of pH range for growth. Among the neutrotolerant acidophilic streptomycetes, 16 representatives were further selected and were subjected to a molecular systematic study based on almost complete 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA relatedness. [Results] The isolates were assigned to 12 color groups, and 80% of them were neutrotolerant acidophilic streptomycetes. The 16 representative strains formed eight distinct subclades within the genus of *Streptomyces*, and probably represented at least eight new genotypic species of *Streptomyces*. [Conclusion] The neutrotolerant acidophilic streptomycetes isolated in this study were placed in eight distinct evolutionary groups, indicating the good diversity and novelty of these microorganisms in acidic soils in Yunnan Province.

**Keywords:** Neutrotolerant acidophilic streptomycetes; 16S rRNA gene; Phylogenetic analysis; Diversity; Evolutionary group

Supported by the Natural Science Foundation of China (30770002) and the National Basic Research Program of China (2004CB719601)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn

Received: 29 October 2007/ Revised: 3 January 2008