

1 株嗜碱放线菌的生理学特性研究及其鉴定^{*}

张永光, 唐蜀昆, 李文均, 徐丽华, 姜成林

(云南大学 云南省微生物研究所, 教育部微生物资源开放研究重点实验室, 云南 昆明 650091)

摘要:对从青海茶卡盐湖岸土样中分离到的 1 株生理较特殊的嗜碱放线菌 YIM80305 的生长 pH 范围, 不同碱性物质 KOH, K_2CO_3 , NaOH, Na_2CO_3 对其生长的影响, 耐 NaCl, KCl 特性进行了研究. 同时从形态, 细胞壁类型, 16S rDNA 等方面进行了鉴定. 结果发现 YIM80305 对 Na^+ 碱性物质有一定依赖性, 对 K^+ 敏感, YIM80305 可能是 *Streptomyces* 属的 1 个新种.

关键词:嗜碱放线菌; Na^+ 依赖性; 16S rDNA

中图分类号: Q 939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2003)06-0549-04

嗜碱放线菌是极端环境中的放线菌的 1 个特殊类群, 其定义, 可参照嗜碱菌的定义^[1], 它们可以产生多种碱性酶^[2]和生物活性物质, 如抗生素^[3,4]和酶的抑制剂^[5]. 由于其产物的特殊性和广阔应用前景, 引起了国际上许多微生物学者的广泛关注.

较早报道嗜碱放线菌是日本的 Mikami^[6], 随后嗜碱放线菌的分类和应用有一些报道. 嗜碱放线菌能够生长在碱性环境, 意味着具有特殊的营养需求、培养条件及生理机制. 有关嗜碱细菌生理学报道有许多, 但有关嗜碱放线菌的目前尚未见报道. 嗜碱放线菌如何适应碱性环境, 与嗜碱细菌在生理特性上有什么差别, 都是我们所不了解的, 这极大地限制了我们对嗜碱放线菌新物种的发现, 限制了我们对其资源的开发利用.

为了了解不同碱性物质及盐是否对其生长产生影响, 我们初步研究 YIM80305 的生长 pH, 范围不同碱性物质 (KOH, K_2CO_3 , NaOH, Na_2CO_3) 对其生长的影响, 及对 NaCl, KCl 的耐性. 研究发现 YIM80305 具有特殊生理特性, 意味着可能是新物种, 并从形态、细胞壁类型, 16S rDNA 全序列对 YIM80305 进行了鉴定.

1 材料与方法

1.1 菌株来源

菌株 YIM80305 为 2001 年从青

海茶卡盐湖岸土样中分离到的 1 株嗜碱放线菌, 分离培养基为土壤浸汁培养基, 用 NaOH 调至 pH10.

1.2 生理学实验

1.2.1 pH 实验 选用麦芽膏-酵母膏琼脂培养基 (ISP2) 为基础培养基. 所用的缓冲液如下: pH6.0, 7.0, 8.0 用 0.1 mol/L KH_2PO_4 - 0.1 mol/L NaOH, pH9.0, 10.0 用 0.1 mol/L $NaHCO_3$ - 0.1 mol/L Na_2CO_3 , pH11.0 用 0.05 mol/L Na_2HPO_4 - 0.1 mol/L NaOH, pH12.0 用 0.2 mol/L KCl - 0.2 mol/L NaOH. 28 ℃ 液体培养, 10 d 观察 1 次, 至 30 d. 实验重复 2 次.

1.2.2 不同碱性物质对生长的影响 基础培养基灭菌后, 分别用饱和 NaOH, Na_2CO_3 , KOH, K_2CO_3 溶液调至相应的 pH 值, 倒平板. 接种, 28 ℃ 培养, 每 10 d 观察 1 次, 至 30 d. 实验重复 2 次. 随后做进一步试验, 即在用 KOH, K_2CO_3 调节的不同 pH 值 (pH8.0~12.0) 基础培养基上, 分别添加质量分数为 1.0%, 2.0%, 3.0% 的 NaCl, 28 ℃ 培养, 每 10 d 观察 1 次, 至 30 d. 实验重复 2 次.

1.2.3 耐盐性实验 基础培养基中分别添加质量分数为 3%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20% 的 NaCl, KCl, 后用 NaOH 调至 pH10, 倒平板. 接种, 28 ℃ 培养, 每 7 d 观察 1 次, 至 21 d. 实验重复 2 次.

* 收稿日期: 2003-01-09

基金项目: 国家科技部基础研究重大项目 (2001CCC00600); 云南省自然科学基金资助项目 (2001C0001Q; 2000C0014M).

作者简介: 张永光 (1976-), 男, 河南人, 硕士生, 主要从事极端环境放线菌的系统分类学研究.

1.3 菌株鉴定方法

1.3.1 形态观察 用酵母膏-麦芽膏琼脂、Horikoshi 嗜碱菌基础培养基^[2]埋片培养,28 培养 28 d,每 7 d 取 1 次片.用光学显微镜 Olympus-BH-2 和电子显微镜 EP mol/L A8705 观察形态.

1.3.2 细胞壁类型分析 采用 Hasegawa^[7]与王平改进的快速薄层层析法(Thin layer chromatography, TLC)^[8]进行全细胞氨基酸及全细胞水解液糖型的分析.

1.3.3 16S rDNA 的 PCR 扩增及其序列测定和分析 基因组总 DNA 按微波炉法^[9]提取,16S rDNA 的扩增参照 Cui 等方法^[10].16S rDNA 的扩增所使用引物是:

Primer A:(对应于 *E. coli* 16S rRNA 5'8~27f)5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';

Primer B:(对应于 *E. coli* 16S rRNA 3'1523~1504)5'-TTA AGG TGA TCC AGC CGC A-3'.

扩增产物经纯化后,用 ABI PRISMTM 377XL DNA Sequencer (Applied biosystems) 测序.将所测的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中调集出相关种和相关属的 16S rDNA 序列比较,构建系统发育树.序列排对用 Clustalx 程序包进行,1 000 次重复抽样自举分析,进化距离矩阵按 Neighbour-joining^[11]方法进行,用 TreeView 程序画进化树.

2 结果与讨论

2.1 生理学特性 YIM80305 的生长范围为 pH7

~12,最适 pH 为 9~10.在用 NaOH 调节的基础培养基上生长范围为 pH7~12,用 Na₂CO₃ 的为 pH7~11,但在用 KOH, K₂CO₃ 的基础培养基上其生长范围为 pH7~8,在 pH8 以上则不能生长.进一步实验发现, YIM80305 在添加有 1%, 2%, 3% NaCl 的用 KOH 调节 pH 的基础培养基上,其生长范围为 pH7~11,在 K₂CO₃ 调节的则为 pH7~9.在添加有少量 NaCl 的用 KOH, K₂CO₃ 调节的基础培养基上,其生长范围比没有添加 NaCl 的增大了许多,添加 NaCl 对 YIM80305 生长有促进作用.显然 YIM80305 对 Na⁺ 有依赖性,特别是在高碱性环境中.

YIM80305 耐受 NaCl 范围为 0~5%,最适质量分数为 3%,不耐受 KCl,有 KCl 存在则不能生长. YIM80305 对 K⁺ 敏感, K⁺ 可能会抑制它的生长.

2.2 菌种鉴定结果

2.2.1 形态特征 菌株 YIM80305 基丝丰富,有分枝,不断裂;有少量气丝,产生孢子链,其形态见图 1.

2.2.2 细胞壁类型 菌株 YIM80305 的细胞壁组分中只含有 LL-DAP,无特征性糖,即细胞壁 I 型.

2.2.3 16S rDNA 全序列的相似性比较和系统发育分析 所测菌株 YIM80305 的 16S rDNA 核苷酸序列为 1 489 bp.将所测序列与从 GenBank 数据库中的已知相关种进行比较,所选菌株及其序列号如表 1 所示,选定 *Streptosporangium roseum* 为外群,构建以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树(图 2).

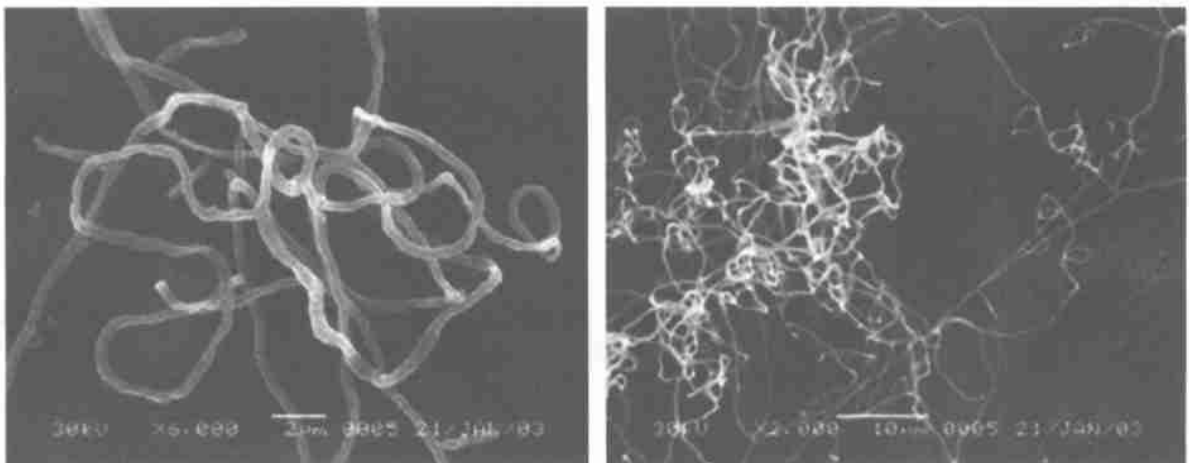


图 1 嗜碱链霉菌 YIM80305 的形态学特征

Fig. 1 Morphological characteristics of alkaliphilic *Streptomyces* sp. YIM80305

表 1 从 GenBank 中调出与 YIM80305 相近的菌株

Tab. 1 Strains related phylogenetically to YIM80305

菌 种	菌株号	登录号
<i>Streptomyces</i> sp.	YIM80305 ^T	AY236339
<i>Streptomyces thermodiastaticus</i>	NAR 85 ^T	AJ001434
<i>Streptomyces mashuensis</i>	DSM40221 ^T	X79323
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i>	DSM40443 ^T	Z68096
<i>Streptomyces thermocarboxydovorans</i>	DSM44296 ^T	U94489
<i>Streptomyces rutgersensis</i>	DSM40077 ^T	Z76688
<i>Streptomyces gougerotii</i>	DSM40324 ^T	Z76687
<i>Streptomyces intermedius</i>	DSM40372 ^T	Z76686
<i>Streptomyces kasugaensis</i>	MB273 - C4 ^T	AB024442
<i>Streptomyces somaliensis</i>	DSM40738 ^T	AJ007403
<i>Streptosporangium roseum</i>	DSM43021 ^T	X89947

在系统进化树上, YIM80305, *Streptomyces mashuensis*, *Streptomyces kasugaensis* 3 株菌构成一个分支, YIM80305 与这 2 株菌的 16S rDNA 全序列的同源性分别为 97.17%, 96.97%, 表明这 3 株菌在系

统进化上是非常接近的. 另一分支上的 7 株菌与菌株 YIM80305 的 16S rDNA 同源性均在 96.28% ~ 97.23% 之间, 与 YIM80305 的 16S rDNA 全序列同源性最大的是 *Streptomyces thermodiastaticus* (97.23%). 但 YIM80305 同 *Streptomyces thermodiastaticus* 不在同一分支上, 尽管它与 *Streptomyces mashuensis* 的同源性 (97.17%) 小于它同 *Streptomyces thermodiastaticus* 的同源性, 但 YIM80305 同 *Streptomyces mashuensis* 在进化上比 *Streptomyces thermodiastaticus* 更接近一些. YIM80305 是从青海茶卡盐湖岸土样中分离到的嗜碱放线菌, 最高生长温度为 37 °C, pH 范围为 pH7 ~ 12, 而 *Streptomyces thermodiastaticus* 是 1 株嗜高温菌, 可在 55 °C 生长, pH6 可以生长, pH10 不生长. 2 株菌分布在 2 个不同的分支上, 系统进化上相差较大, 它们的生理特性差异也可证实这一点.

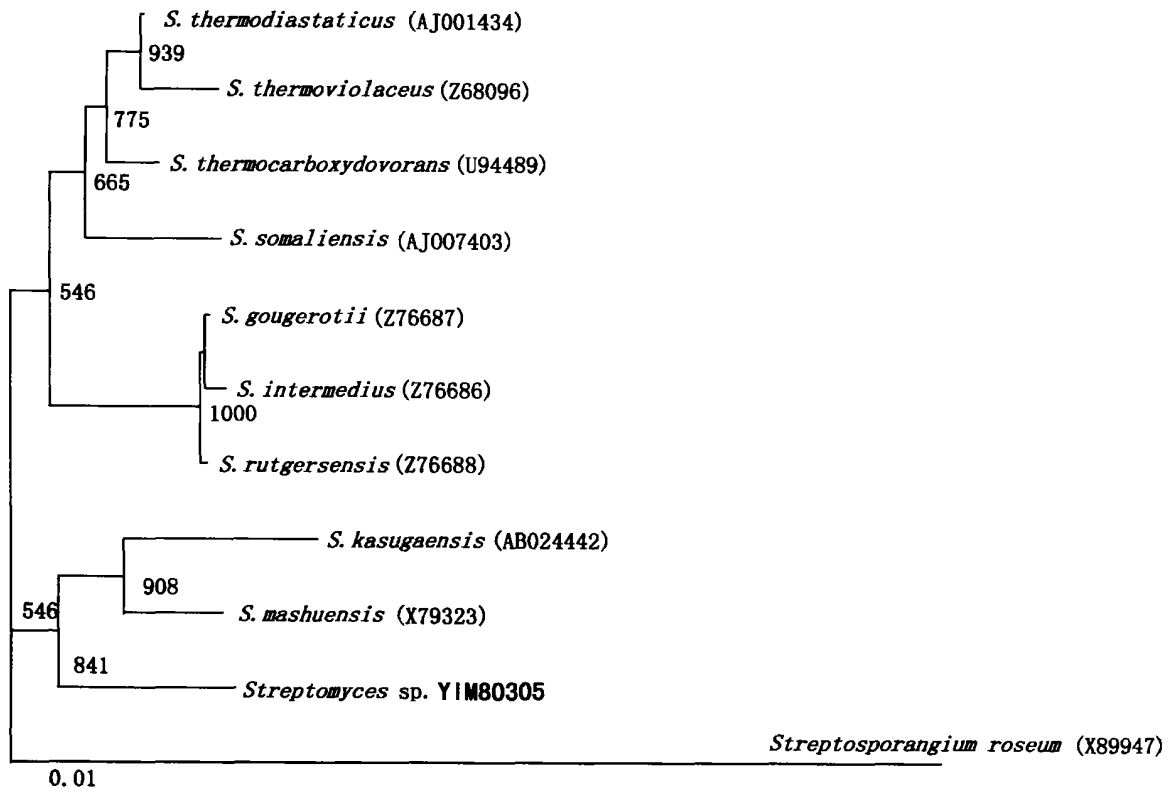


图 2 依据 16S rDNA 序列构建的菌株 YIM80305 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence showing the positions of YIM80305 and related strains

2.3 讨论 不同碱性物质对 YIM80305 的生长有影响, NaCl, KCl 对其生长也有影响. 在碱性条件下 YIM80305 对 Na⁺ 有一定的依赖性, 对 K⁺ 敏感, K⁺

能抑制它的生长. 嗜碱放线菌对 Na⁺ 依赖性的现象, 以前国内外未见报道. 这种嗜碱放线菌对 Na⁺ 的依赖性可能同嗜碱 *Bacillus* sp. 一样, Na⁺ 在嗜碱

Bacillus sp. 的嗜碱性中起着决定作用^[12].

从 YIM80305 的形态特征,细胞壁类型,及 16S rDNA 序列分析结果,可以确定其属于 *Streptomyces* 属. YIM80305 与 *Streptomyces mashuensis* 在系统发育的关系,比与嗜高温菌 *Streptomyces thermodiasticus* 的更接近一些,但两者差异为 2.83%. 链霉菌是细菌域中数量最大的 1 个属,一般认为 *Streptomyces* 属菌株的 16S rDNA 序列的同源性小于 98% 即可,不必局限于新种必需满足 16S rDNA 序列的同源性小于 97%^[13],但必须有充分理由. 因此 YIM80305 可能是 *Streptomyces* 属的 1 个新种,要确定为新种还有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] TSUJIBO H, SATO T, INUI M, et al. Intracellular accumulation of phenazine antibiotics produced by an alkaliphilic actinomycete. Taxonomy, isolation and identification of the phenazine antibiotics [J]. Agric Biol Chem, 1988, 52(2): 301—306.
- [2] HORIKOSHI K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1999, 63(4): 735—750.
- [3] TSUJIBO H, SAKAMOTO T, MIYAMOTO K, et al. Isolation of cytotoxic substance, Kalafungi from an alkaliphilic actinomycetes, *Nocardopsis dassonvillei* subsp *prasina* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1990, 38(8): 2299—2300.
- [4] BAHN Y S, PARK J M, BAI D H, et al. YUA001, a novel aldose reductase inhibitor isolated from alkaliphilic *Corynebacterium* sp YUA25. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization [J]. J Antibiot, 1998, 51(10): 902—907.
- [5] KRULWICH T A, GUFFANTI A A. Alkaliphilic bacteria [J]. Annu Rev Microbiol, 1989, 26: 663—677.
- [6] MIKAMI Y, MIYASHITA K, ARAI T. Diaminopimelic acid profiles of alkaliphilic and alkaline-resistant strains of actinomycetes [J]. J Gen Microbiol, 1982, 128(8): 1709—1712.
- [7] HASEGAWA T, TAKIZAWA M, TANIDA S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes [J]. J Gen Appl Microbiol, 1983, 29: 319—322.
- [8] 王平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法 [J]. 微生物学通报, 1986, 13: 228—230.
- [9] ORSINI M, ROMANO S V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples [J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(1): 17—20.
- [10] CUI X L, MAO P H, ZENG M, et al. *Streptimonospora salina* gen nov, sp nov, a new member of the family *Nocardioleaceae* [J]. Int J Sys Evol Microbiol, 2001, 51: 357—363.
- [11] SAITOU N, NEI M. The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree [J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406—425.
- [12] KRULWICH T A, ITO M, GUFFANTI A A. The Na⁺ dependence of alkaliphily in *Bacillus* sp [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1505: 158—168.
- [13] STACKEBRANDT E, GOEBEL B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rDNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology [J]. Int J Sys Bacteriol, 1994, 44(4): 846—849.

Studies on physiological characteristics and identification of an alkaliphilic actinomycete

ZHANG Yong-guang, TANG Shu-kun, LI Wen-jun, XU Li-hua, JIANG Cheng-lin
(Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, The Key Laboratory for
Microbial Resources of Ministry of Education, P. R. China, Kunming 650091, China)

Abstract: pH, effects of different alkaline materials KOH, K₂CO₃, NaOH, Na₂CO₃ on the growth, and NaCl, KCl tolerance of one alkaliphilic actinomycete YIM80305 were studied. The strain, which was isolated from the sample in Chaka Salt Lake, Qinghai Province has typically physiological characteristics. YIM80305 was identified by the morphology, cell wall type, 16S rDNA sequence analysis. Results showed that YIM80305 is Na⁺-obligately dependent, and show K⁺-sensitivity. And YIM80305 is a member of *Streptomyces*.

Key words: alkaliphilic actinomycetes; Na⁺-obligately dependent; 16S rDNA