

三株沙漠放线菌 XJSS-21、XJSS-39 和 XJSS-58 的多相分类及特性研究

魏艳红¹ 阿不都克里木·热依木² 熊 鹰¹ 许尚营¹ 邓子厚¹ 袁永泽¹ 刘德立^{1*}

(1. 华中师范大学生命科学学院遗传调控与整合生物学重点实验室 湖北 武汉 430079)

(2. 新疆师范大学生命科学与化学学院 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 从新疆吐鲁番鄯善县典型沙漠地区采集的样品中分离获得 3 株放线菌菌株 XJSS-21、XJSS-39 和 XJSS-58, 对其形态特征、生理生化特性、反硝化能力、细胞壁化学组分以及 16S rRNA 基因序列等进行了多相分类研究, 发现 3 株沙漠放线菌均能产生纤维素酶, 淀粉酶和蛋白酶, 且菌株 XJSS-21 具有很强的反硝化能力, XJSS-58 属于轻度耐盐菌。初步确定 XJSS-21、XJSS-39 和 XJSS-58 可能分别属于 *Streptomyces humidus* subsp. *antitumoris*、*Nocardiopsis dassonvillei* 和 *Streptomyces mutabilis*。

关键词: 沙漠放线菌, 链霉菌属, 拟诺卡氏菌属, 多相分类, 特性

Polyphasic Taxonomy and Characteristics of Three Desert Actinomycosis XJSS-21, XJSS-39 and XJSS-58

WEI Yan-Hong¹ ABDUKERIM Rehim² XIONG Ying¹
XU Shang-Ying¹ DENG Zi-Hou¹ YUAN Yong-Ze¹ LIU De-Li^{1*}

(1. College of Life Sciences Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, Huazhong Normal University, Wuhan, Hubei 430079, China)

(2. College of Life Science and Chemistry, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

Abstract: Three actinomycete strains XJSS-21, XJSS-39 and XJSS-58 were isolated from soil sample collected from typical desert areas in Shanshan County, Turpan City, Xinjiang Province. Based on the polyphasic studies, including their morphology, physiological and biochemical characteristics, denitrifying capability, chemotaxonomy and 16S rRNA gene sequence analysis, we found that three desert actinomycetes are able to produce cellulase, amylase and protease, the strain XJSS-21 has a strong capacity to denitrification, XJSS-58 belongs to the mild salt-tolerant bacteria. XJSS-21, XJSS-39 and XJSS-58 were primarily identified as *Streptomyces humidus* subsp. *antitumoris*, *Nocardiopsis dassonvillei* and *Streptomyces mutabilis*.

Keywords: Desert actinomycosis, *Streptomyces*, *Nocardia*, Polyphasic taxonomy, Characteristics

放线菌广泛存在于不同的自然生态环境中, 种类繁多、代谢功能各异。许多放线菌既可以产生抗

生素和具有生物活性的次生代谢物质,又可用于生物处理废物过程,具有重要的商业价值^[1]。新疆具有大面积的典型沙漠区,蕴藏着极为宝贵丰富的沙漠放线菌资源^[2]。沙漠地区气候比较特殊,干旱、营养成分缺乏、表面温度较高,沙漠放线菌长期生活和适应这类特殊的环境条件,具有独特的遗传变异类型、生理机制及特殊的次生代谢产物,具有很高的研究价值,在生物进化及系统发育等研究中也具有重要的理论意义^[3]。沙漠放线菌是极端环境微生物的重要组成部分,迄今为止,国内外在该方面的研究报道较为少见。

本研究从新疆鄯善县典型的沙漠土壤中,分离到3株放线菌菌株XJSS-21、XJSS-39和XJSS-58。通过对其形态特征、培养特征、生理生化特性、反硝化能力测定以及细胞壁化学组分分析以及16S rRNA基因序列进行了多相分类研究,初步确定XJSS-21和XJSS-58可能分属于链霉菌属的*Streptomyces humidus* subsp. *Antitumoris*和*Streptomyces mutabilis*,XJSS-39可能属于拟诺卡氏菌属的*Nocardiopsis dassonvillei*。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源:从新疆鄯善县典型沙漠区红柳、芦苇根周围采集沙漠样品,适当处理后,用添加50 mg/L重铬酸钾的HV琼脂培养基^[4]和高氏一号培养基进行菌种分离,30°C培养5 d~7 d,纯化得到3株放线菌菌株,编号为XJSS-21、XJSS-39和XJSS-58。

1.1.2 主要仪器和试剂:PCR扩增仪(美国生科公司)、凝胶成像系统(Bio-Rad)、光学显微镜(Nicon);DNA聚合酶、dNTP、pMD18-T载体、*EcoR*和*Hind* 酶(TaKaRa公司)。

1.2 形态和培养特征观察

将放线菌菌株接种到燕麦片琼脂培养基、察氏琼脂培养基、营养琼脂培养基、高氏一号培养基、马铃薯浸汁琼脂培养基和无机盐淀粉琼脂培养基上,30°C培养14 d,观察其培养特征,包括生长情况、基丝颜色、气丝颜色、孢子形状、孢子链特征、有无可溶性色素等。用燕麦片琼脂培养基埋片培养,30°C培养21 d后取埋片,光学显微镜观察其微观形态特征。

1.3 生理生化特性

按Shirling和Gottlieb^[5]等人的方法进行生理生

化特性研究。观察并分析碳源的利用、酶类产生、黑色素产生等特征。

NaCl耐受实验:ISP5^[5]作为基础培养基,添加NaCl浓度分别为:0%、2%、4%、6%、8%、10%、12%。培养基与盐分别灭菌后充分混匀,倒平板,30°C条件下培养21 d,每3 d~5 d观察记录,重复2次。

温度耐受实验:高氏一号琼脂作为基础培养基。不同温度条件下培养30 d,每2 d~3 d观察记录,重复2次。

pH耐受实验:ISP5作为基础培养基,pH梯度设定为pH 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0和12.0。30°C条件下培养21 d,每3 d~5 d观察并记录,重复2次。

1.4 反硝化能力测定

生物脱氮是从废水中去除氮素污染的较为经济有效的方法之一。传统生物脱氮包括硝化和反硝化2个过程^[6],将水中氮素完全去除需要反硝化作用才能完成。

将3种沙漠放线菌以10%的接种量接种于SC培养基^[7]中,30°C培养,于2 h、4 h、6 h、8 h、10 h和12 h分别取样,测定培养基中剩余的NO₃⁻浓度和NO₂⁻浓度,计算其反硝化率。采用磺酸Brucine法检测培养基中剩余的NO₃⁻量^[8],采用甲基橙褪色法检测培养基中剩余的NO₂⁻量^[9]。

1.5 细胞壁化学组成分析

采用王平^[10]改进的快速薄层层析(TLC)方法进行全细胞水解液氨基酸以及全细胞水解液糖型的分析。

1.6 16S rRNA基因序列确定与分析

1.6.1 总DNA的提取及16S rRNA基因扩增:总DNA的提取参考Kutchma AJ^[11]的方法并有所改进。16S rRNA基因的扩增与克隆参照分子克隆手册进行。PCR扩增采用以下引物:P1:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';P2:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。反应条件为:95°C 30 s;54°C 30 s,72°C 1 min 30 s,30个循环;72°C 5 min。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6.2 16S rRNA基因序列测定及分析:利用胶回收试剂盒回收PCR产物,与pMD18-T进行连接,反应体系为10 μL(T载体1 μL,PCR产物5 μL,连接缓冲液4 μL),16°C连接过夜。取10 μL连接反应液转化*E. coli* DH5α感受态细胞,涂布在含氨苄青霉素的LB平皿上,37°C培养过夜挑选单克隆继续培

养后提质粒, 利用限制性内切酶 *EcoR* / *Hind* 双酶切以及 *EcoR* 单酶切验证。取经酶切鉴定后的阳性克隆, 送由上海英俊生物技术有限公司测序。据测序结果, 利用 Blast 软件从 GenBank 数据库中搜索相关放线菌菌株的 16S rRNA 基因序列, 随后用 MEGA 软件进行多序列比对以及构建系统进化树和同源性比较。

2 结果

2.1 形态和培养特征

菌株 XJSS-21、XJSS-39 和 XJSS-58 在燕麦片琼脂培养基上生长最好, 马铃薯浸汁琼脂、高氏一号琼脂、察氏琼脂培养基上生长适中, 无机盐淀粉琼脂、营养琼脂培养基上生长均较差。其中 XJSS-58 菌株在燕麦片琼脂培养基上产生棕褐色的可溶性色素。3 株沙漠放线菌菌株 NaCl 耐受实验结果表明菌株 XJSS-21 和 XJSS-39 的最高耐盐度均为 8%, 而菌

株 XJSS-58 的最高耐盐度达到 10%, 属于轻度耐盐菌。3 株沙漠放线菌菌株最适生长温度均为 37°C。菌株 XJSS-21 和 XJSS-39 的最适生长 pH 均为 7.0, XJSS-58 的最适生长 pH 为 8.0。

菌株 XJSS-21 的气生菌丝和基内菌丝均较丰富, 但颜色差异较大。气生菌丝从灰白到棕黄颜色不等。基内菌丝纤细分支不断裂。孢子链呈现独特的串状, 成簇聚在一起, 较长且螺旋缠绕(图 1A), 孢子为椭圆形。无可溶性色素产生。菌株 XJSS-39 气生菌丝较稀少, 主要呈黄棕色, 基内菌丝颜色较单一, 也为黄棕色。气生菌丝上着生长短不一的孢子链(图 1B), 较伸直, 很少螺旋缠绕, 孢子近似圆形。菌株 XJSS-58 气生菌丝较稀少, 主要呈灰色, 基内菌丝分支不断裂, 颜色差异较大, 气生菌丝上着生长长的孢子链(图 1C), 较伸直, 无螺旋缠绕。孢子近似圆形。菌株 XJSS-21、XJSS-39 和 XJSS-58 的培养特征见表 1。

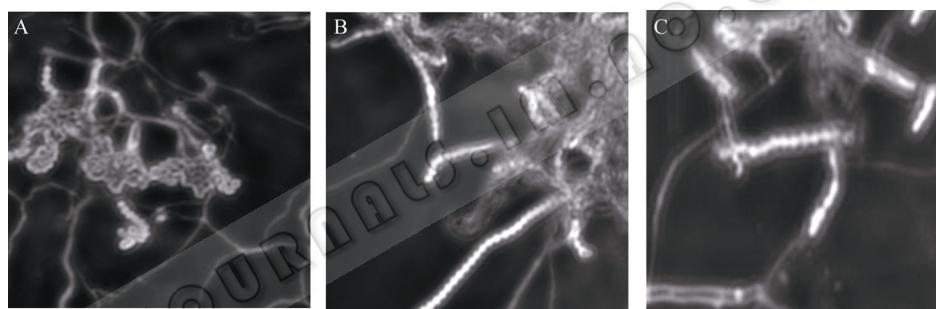


图 1 三株沙漠放线菌菌株在燕麦片琼脂培养基上培养的光镜照片(×1000)

Fig. 1 Morphological characteristics of three desert actinomycosis on Oatmeal agar medium(×1000)

Note: A: XJSS-21; B: XJSS-39; C: XJSS-58.

表 1 三株沙漠放线菌菌株的培养特征
Table 1 Cultural characteristics of three desert actinomycosis

培养基 Culture medium	气生菌丝 Aerial hyphae			基内菌丝 Substrate mycelium			可溶性色素 Dissoluble pigment		
	XJSS-21	XJSS-39	XJSS-58	XJSS-21	XJSS-39	XJSS-58	XJSS-21	XJSS-39	XJSS-58
燕麦片琼脂 Oatmeal Agar	浅黄色 Fawn	棕黄色 Brown	青灰色 Green gray	浅黄色 Light yellow	棕黄色 Brown	棕褐色 Tan	无 None	无 None	棕褐色 Tan
察氏琼脂 Czapek Dox Agar	灰白色 Offwhite	乳白色 Oyster white	深灰色 Dark gray	灰色 Gray	乳白色 Oyster white	灰绿色 Sage green	无 None	无 None	无 None
营养琼脂 Nutrient Agar	乳白色 Oyster white	黄褐色 Tawny	灰白色 Off white	棕色 Brown	深黄色 Deep yellow	黄色 Yellow	无 None	无 None	无 None
高氏一号琼脂 Gause's No.1 Agar	灰色 Gray	浅棕色 Light brown	灰色 Gray	浅灰色 Light gray	黄色 Yellow	灰色 Gray	无 None	无 None	无 None
马铃薯浸汁琼脂 Potato Juice Agar	浅黄色 Light yellow	棕色 Brown	灰色 Gray	浅黄色 Light yellow	棕色 Brown	灰黑色 Dark gray	无 None	无 None	无 None
无机盐淀粉琼脂 Starch Inorganic Salt Agar	乳白色 Oyster white	黄色 Yellow	灰色 Gray	乳白色 Oyster white	黄色 Yellow	灰色 Gray	无 None	无 None	无 None

2.2 生理生化特性

三株沙漠放线菌菌株的生理生化特性见表 2。

菌株 XJSS-21 :明胶液化呈阳性, 牛奶凝固和胨化强, 水解淀粉, 可分解纤维素, 产生硫化氢, 产生黑色

表 2 三株沙漠放线菌菌株部分生理生化特性
Table 2 Physiological and biochemical properties of three desert actinomycosis

特征 Characteristic	XJSS-21	XJSS-39	XJSS-58	特征 Characteristic	XJSS-21	XJSS-39	XJSS-58
明胶液化 Gelatin liquefying	+	+	+	葡萄糖 Glucose	+	+	+
牛奶胨化 Milk freezing	+	+	-	纤维二糖 Cellobiose	-	-	-
牛奶凝固 Milk solidification	+	+	-	鼠李糖 Rhamnose	-	-	+
硫化氢 Hydrogen sulfide	+	-	+	阿拉伯 Arabinose	-	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	密二糖 Melibiose	-	-	-
淀粉水解 Amylolysis	+	+	+	棉子糖 Raffinose	-	-	-
纤维素酶 Cellulase	+	+	+	麦芽糖 Maltose	-	+	+
脲酶 Urease	-	+	-	甘油 Glycerin	+	+	+
卵磷脂酶 Lecithin enzyme	-	-	-	肌醇 Inositol	+	+	+
油脂水解 Oil hydrolysis	-	-	+	山梨醇 Sorbitol	-	-	-
黑色素产生 Melanin production	+	-	+	赤鲜醇 Red Xianchun	-	-	-
利福平耐性 Rifampicin endurance (50 µg/mL)	-	-	-	木糖醇 Xylitol	-	-	-
青霉素耐性 Penicillin endurance (6 µg/mL)	+	+	+	甘露醇 Mannitol	+	+	+
抗生素产生 Antibiotics production	-	-	-	七叶苷 Aesculin	+	+	+
D-甘露糖 D-mannose	+	+	+	黄嘌呤降解 Degradation of xanthine	-	-	-
D-果糖 D-fructose	+	+	+	酪氨酸降解 Degradation of tyrosine	+	+	+
D-木糖 D-xylose	+	+	+	最适生长温度/°C The optimum growth temperature	37°C	37°C	37°C
D-半乳糖 D-galactose	+	+	-	最适生长 pH The optimum growth pH	7.0	7.0	8.0
蔗糖 Sugar	+	+	+	NaCl 耐受 NaCl tolerance	8%	8%	10%
D-乳糖 D-galactose	-	+	+	马尿酸钠 Sodium Iodohippurate	-	+	+

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应.

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

素, 不产生尿素酶, 能利用大部分供试碳源。菌株 XJSS-39: 牛奶凝固和胨化强。明胶液化、水解淀粉、纤维素分解、尿素酶产生均呈阳性。黑色素和硫化氢产生呈阴性。能利用大部分供试碳源。菌株 XJSS-58: 明胶液化呈阳性, 牛奶凝固和胨化不强, 可分解纤维素, 淀粉水解, 尿素酶产生呈阴性, 产生黑色素和硫化氢, 能利用大部分供试碳源。

2.3 反硝化能力测定

XJSS-21 在 SC 培养基具有较好的反硝化能力, 能在 8 h 内将 10 mmol/L 的 NO_3^- 几乎全部去除, 反硝化率接近 100%, 且无 NO_2^- 的积累(图 2)。

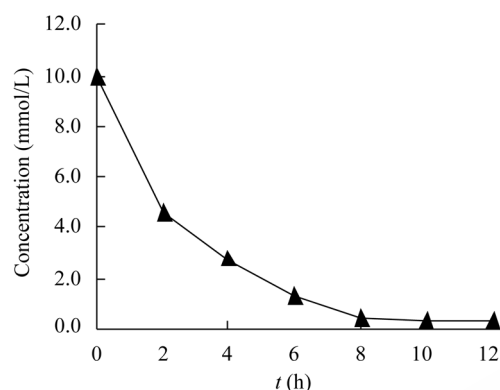


图 2 XJSS-21 反硝化能力测定(NO_3^- 去除率)
Fig. 2 Denitrification by XJSS-21 (rate of NO_3^- removal)

XJSS-39 和 XJSS-58 可以在以 NO_3^- 为唯一氮源的 SC 培养基中很好的生长, 但是测定到的反硝化能力不强, NO_3^- 不能在短时间内有效去除, 而且有 NO_2^- 的积累。

2.4 细胞壁化学组成分析

放线菌的全细胞水解物氨基酸和糖的种类是确定细胞壁类型和最终决定放线菌归属的重要指标之一。菌株 XJSS-21 和菌株 XJSS-58 的纯细胞壁氨基酸主要含有 LL-DAP, 且含甘氨酸, 属于胞壁型。菌株 XJSS-21 全细胞糖水解产物主要含半乳糖、阿拉伯糖。菌株 XJSS-58 全细胞糖水解产物主要含葡萄糖、半乳糖。菌株 XJSS-39 的纯细胞壁氨基酸含有 meso-DAP, 属于胞壁型。全细胞糖水解产物主

要含半乳糖、阿拉伯糖。

2.5 16S rRNA 基因序列分析

菌株 XJSS-21 的 16S rRNA 基因序列长度为 1494 bp, XJSS-39 的 16S rRNA 基因序列长度为 1492 bp, XJSS-58 的 16S rRNA 基因序列长度为 1499 bp。以上 3 株沙漠放线菌菌株的 16S rRNA 基因序列已被 GenBank 注册, XJSS-21、XJSS-39 和 XJSS-58 的注册号分别为 EU598255、EU598256 和 EU598257。

将这 3 株沙漠放线菌的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 中进行 Blast 比对, 利用比对结果从 GenBank 数据库收集相关放线菌菌株的 16S rRNA 基因序列, 运用 MEGA 软件 Clustal W 进行多序列比对分析, 按照 Neighbor-joining 法构建系统进化树(见图 3)。如图 3 所示, XJSS-21 属于链霉菌属, 它与链霉菌属的 *S. humidus* subsp. *antitumoris* 和 *S. macrosporeus* 聚为同一支, 进化距离最近。XJSS-39 属于拟诺卡氏菌属, 它与 *N. dassonvillei* 的进化距离最近。XJSS-58 也属于链霉菌属, 它与链霉菌属的 *S. mutabilis* 和 *S. maritimus* 聚为同一支, 具有最近的同源关系。

3 分析与讨论

综合以上 3 株沙漠放线菌菌株的形态和培养特征、生理生化特性、反硝化能力以及细胞壁化学组成分析发现, 菌株 XJSS-21 和 XJSS-58 具有典型链霉菌属的特征, 而 XJSS-39 具有典型拟诺卡氏菌属的特征。将这 3 株沙漠放线菌的 16S rRNA 基因序列同从 GenBank 数据库调集的其他放线菌的链霉菌属和拟诺卡氏菌属相关菌株相比, 结合构建的进化树分析发现: XJSS-21 与 *S. humidus* subsp. *antitumoris* 和 *S. macrosporeus* 聚为同一支, 序列相似性分别为 99.73% 和 99.06%。XJSS-58 与 *S. mutabilis* 和 *S. maritimus* 聚为一支, 序列同源性分别为 99.93% 和 99.13%。XJSS-39 与 *N. dassonvillei* 序列相似性达到了 99.65%。综合以上各个方面, 可以初步确定 XJSS-21 可能属于 *S. humidus* subsp. *antitumoris*, XJSS-39 可能属于 *N. dassonvillei*, XJSS-58 可能属于 *S. mutabilis*。

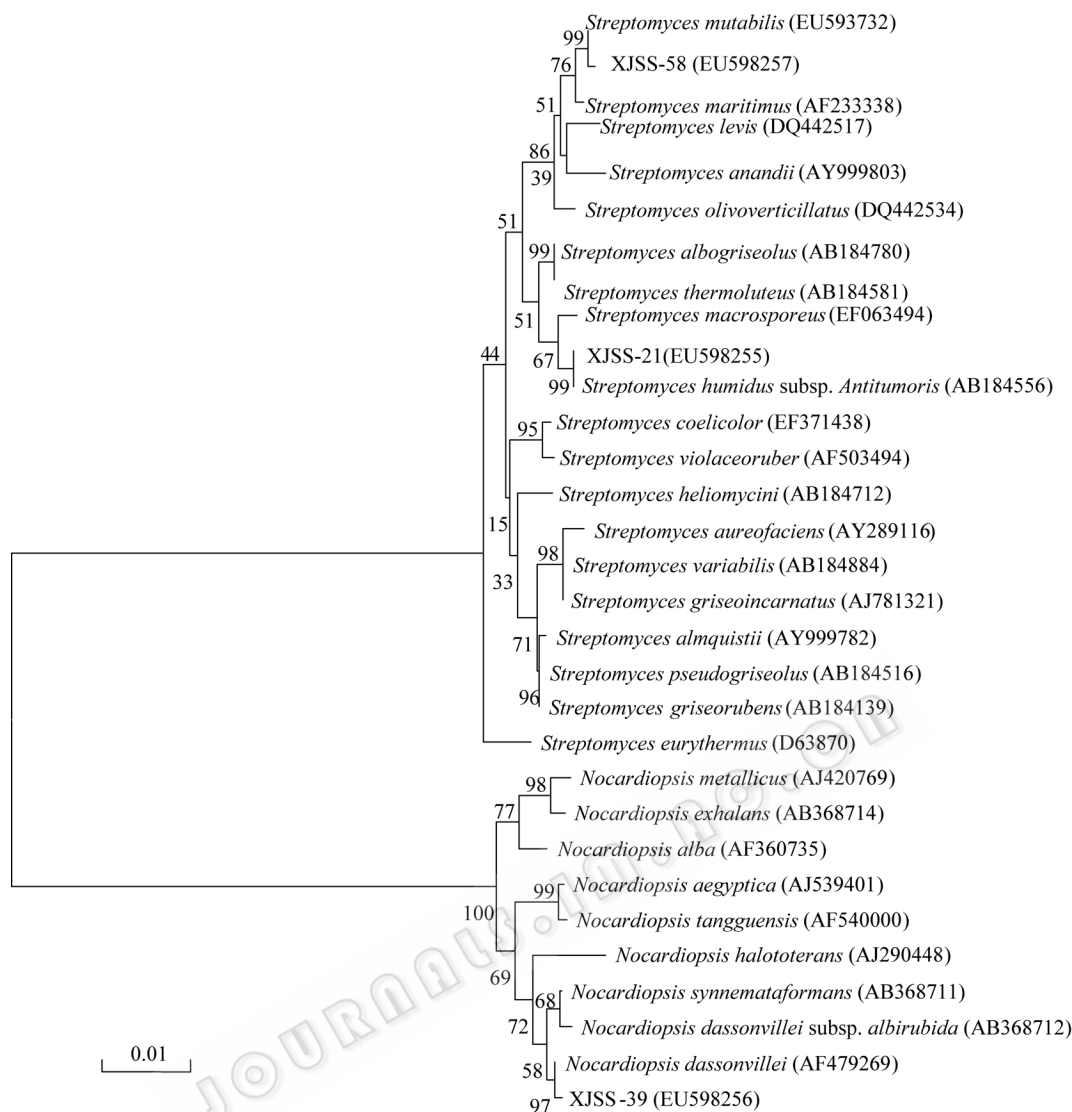


图3 基于16S rRNA基因序列用Neighbour-joining法构建的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree showing the relationships among type strains and experimental strains based on 16S rRNA sequences with Neighbour-joining method

注：标尺表明每个碱基发生0.01次置换，分枝上的数值为自举值。

Note: The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position. Seqboot values were showed on the branches.

参考文献

- [1] Okami Y, Hotta K. Search and discovery of new antibiotics in actinomycetes in biotechnology (Goodfellow M, Williams ST and Mordarski M Eds). London: Academic press, 1988, pp.36-37.
- [2] 李宏彬, 索菲娅. 新疆特殊生境下微生物资源. 干旱地区农业研究, 2004, 22(4): 198-202.
- [3] Antranikian G, Aguilar A. First meeting on biotechnology of extremophiles. Hamburg: Technical University Hamburg, Harburg, 1993.
- [4] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Ferment Technol*, 1987, 65: 501-509.
- [5] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, 16: 313-340.
- [6] 王弘宇, 马放, 苏俊峰, 等. 不同碳源和碳氮比对一株好氧反硝化细菌脱氮性能的影响. *环境科学学报*, 2007, 27(6): 968-972.
- [7] Patureau D, Zumstein E, Delgenes JP. Aerobic denitrification isolation from diverse natural and managed ecosystems. *Microbiol Ecol*, 2000, 39: 145-152.
- [8] APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington DC, USA: American Public Health Association, 1995.
- [9] 匡云飞, 邓培红, 冯泳兰, 等. 甲基橙褪色光度法测定亚硝酸根的研究. *化学世界*, 2004, 4: 181-182.
- [10] 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. *微生物学通报*, 1986, 13(5): 228-230.
- [11] Kutchma AJ, Roberts MA, Knaebel DB, et al. Small-scale isolation of genomic DNA from *Streptomyces* mycelia of spores. *Bio Tech*, 1998, 24: 452-457.