

一株产胞外多糖植物内生菌 EJS-3 菌株的分离和鉴定

孙力军^{1,2}, 陆兆新^{1,*}, 刘俊¹, 吕凤霞¹, 别小妹¹, 杨胜远¹

(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2.安徽科技学院工学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要: 从中药植物—百部的组织中分离到一株高产胞外多糖的植物内生菌 EJS-3 菌株, 该菌株在产糖培养基中可以得到 23.6g/L 的胞外多糖, 转化率为 47.2%(g EPS/g 蔗糖)。通过 16S rRNA 基因序列分析对该菌株进行了鉴定。通过 PCR 扩增, 得到 1450bp 的 16S rRNA 序列。PCR 产物序列通过 BLAST 软件在 NCBI 网站中进行同源性比较。通过 Bioedit 7.0 和 Treedrawing 软件绘制系统发育树。结果显示, EJS-3 的 16S rRNA 序列和数据库中的类多粘芽孢杆菌 KCTC1663 菌株的序列的同源性为 99.31%。在细菌系统发育分类学上, EJS-3 菌株归属多粘类芽孢杆菌(Paenibacillus polymyxa)。

关键词: 内生菌; 胞外多糖; 多粘类芽孢杆菌; 16S rRNA; 鉴定

Isolation and Identification of An Endophytic Strain EJS-3 Producing Exopolysaccharide

SUN Li-jun^{1,2}, LU Zhao-xin^{1,*}, LIU Jun¹, LÜ Feng-xia¹, BIE Xiao-mei¹, YANG Sheng-yuan¹

(1.College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
2.School of Industry, Anhui Science and Technology College, Fengyang 233100, China)

Abstract: An endophytic strain EJS-3 producing exopolysaccharide (EPS) of 23.6g/L was derived from tissues of *Stemona japonica* (Blume) Miq and identified on the base of 16S rRNA gene sequences. The sequence fragment of 1450bp 16S ribosomal RNA was amplified from total DNA of strain EJS-3 by PCR. The sequence analysis was complete by the application of BLAST on the websites of NCBI and phylogenetic tree was drawn with Bioedit 7.0 and Treedrawing. The results showed that EJS-3 shares 99.31% 16S rRNA sequence homology with *Paenibacillus polymyxa* KCTC 1663. In phylogenetic framework of bacteria classification, strain EJS-3 belongs to *Paenibacillus polymyxa*.

Key words: endophyte; exopolysaccharide; *Paenibacillus polymyxa*; 16S rRNA; identification

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2006)07-0065-04

近年来, 微生物多糖因其安全无毒, 理化性状独特等优良的特性而倍受关注。目前已将其作为胶凝剂、成膜剂、乳化剂等广泛应用于食品、制药、石油、化工等多个领域^[1,2]。筛选优质的多糖产生菌, 研究多糖的结构特性以及发酵工艺的优化是当前的热点^[3]。植物内生菌是一个新开发的领域, 已成为活性物质的重要来源^[4]。由植物内生菌产生的生物活性物质往往是新颖的, 可能具有某些特殊的性状为工农业生产所用^[4]。作者在中药植物—百部的组织中分离到一株能产生大量胞外多糖(exopolysaccharide, EPS)的植物内生菌 EJS-3 菌株, 该菌株在摇瓶发酵中从蔗糖到多糖的转化率达到 47.2%, 在生产实际中具有很好的应用前景。明确该菌在分类学上的地位, 是进行进一步研究的基础。本实验通过常

规方法及 16SrRNA 基因序列分析的分子生物学方法, 对该菌株进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

选择百部生长旺盛的植株, 取一定量的茎、叶、块根, 于干净的保鲜袋中, 取回后 4℃ 保存备用。材料取自安徽科技学院中药园。

1.2 仪器

冷冻离心机(centrifuge 5804R) Eppendorf公司; 水平 EPS604 稳压电泳仪 南京科宝仪器公司; FR-9800 紫外-可见分析装置 上海复日科技有限公司; 电子天平 BS-200S Sartorius公司; UV-2450 分光光度计 SHIMADZU

收稿日期: 2005-08-15

*通讯作者

作者简介: 孙力军(1965-), 男, 副教授, 博士研究生, 主要从事微生物及生物技术的研究。

公司; HYG-A 全温摇瓶柜 太仓实验设备厂; PCR 仪 PTC-100TM MJ Research 公司。

1.3 试剂

TE、溶菌酶、RNase、SDS、平衡酚 天津 H&Y Bio. Co. Ltd.; fD1 primer、rP1 primer 北京三博远志生物技术公司; Taq 酶、10 × PCR buffer、dNTP、DNA Marker 北京清华天为生物技术公司。

1.4 内生菌分离方法

分别取百部的根、茎、叶用自来水洗净后, 70% 酒精表面 1min, 清洗后, 再用 0.1% L 汞表面消毒(根、茎 1min, 叶片 30s), 无菌水冲洗 3 次。以无菌刀片切成 1cm 小段, 贴于 PDA 固体培养基表面, 28℃ 培养逐日观察, 根据菌落形态、颜色等挑取单菌落, 按常规方法纯化后保存。以组织消毒后最后 1 次清洗无菌水 0.1ml, 涂于培养基表面, 检验样品表面消毒是否彻底。

1.5 菌体形态及生理生化试验

根据分离菌的菌落和菌体形态, 鞭毛和芽孢的有无和着生情况, 革兰氏染色以及生理生化反应, 按东秀珠方法^[5]进行初步分类。

1.6 基于 16S rRNA 基因序列的分子生物学鉴定

1.6.1 细菌总 DNA 的制备

方法见文献[6]。

1.6.2 16S rRNA 的 PCR 扩增和序列测定

用于 16S rRNA 的 PCR 反应的引物为一对通用引物(由北京三博远志生物技术有限公司合成)。正向引物 fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Escherichia coli 对应位置 8-27) 和反向引物 rP1: 5'-ACGGTTACCTTGTTA CGACTT-3' (E. coli 对应位置 1491-1511)。PCR 反应体系(50μl)为: 10 × PCR 缓冲液 5μl, dNTP(2.0mmol/L)4μl, 引物 fD1 和 rP1 引物各 1μl, 模板 DNA 1μl, Taq 酶 1U, 超纯水 37μl。PCR 程序为: 95℃ 5min; 94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 3min, 循环 30 次; 72℃ 10min。PCR 产物的纯化和测序由上海生工生物技术公司完成。

1.6.3 序列分析及系统发育树绘制

PCR 产物序列通过 BLAST 在 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 基因库中进行同源性比较。通过 Bioedit7.0 和 Treedrawing 软件绘制系统发育树并将其鉴定到种^[7]。

1.7 粘多糖的发酵和测定

1.7.1 培养基及培养方法

液体种子培养基(g/L): 蔗糖 20, 蛋白胨 6, 酵母膏 2, K₂HPO₄ 2, MgSO₄ · 7H₂O 0.1, pH7.0。

基础发酵培养基(g/L): 碳源 30, 氮源 8, K₂HPO₄ 2, MgSO₄ · 7H₂O 0.1, pH7.0。

培养条件: 将种子液按 10% 接种量接入装有 50ml 发

酵培养基的 250ml 三角瓶中, 30℃, 180r/min, 摇瓶培养 72h。

1.7.2 分析测定方法

取 1ml 发酵液稀释 10 倍后, 以分光光度计 600nm 处测 OD 值, 表示发酵液菌体生长量。采用精密 pH 计, 测定发酵液 pH。采用文献[8]的方法, 测定发酵液胞外多糖含量。

2 结果与分析

2.1 内生菌株 EJS-3 的分离及其胞外多糖发酵代谢曲线

从百部组织中分离到一株产生粘多糖的内生菌株, 编号为 EJS-3。采用摇瓶发酵方式, 在发酵过程中检测菌体(Biomass)生长、胞外多糖(EPS)生成以及发酵过程的 pH 变化。结果见图 1。由实验结果可以看出, 前 24h 菌体生长速度迅速, 随后进入到稳定期。与之相对应, pH 值从初始的 7.50 逐渐降低到 5.48。胞外多糖的合成随菌体生长量的不断上升而升高, 与菌体生长呈现一定的相关性, 到 84h 多糖产量达到了最高峰, 约为 23.6g/L, 转化率为 47.2%(g EPS/g 蔗糖)。

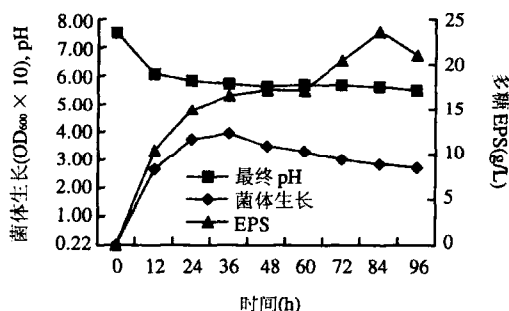


图 1 EJS-3 菌株胞外多糖发酵进程
Fig.1 Fermentation process of EPS by strain EJS-3

2.2 菌株的培养特征及生理生化鉴定

2.2.1 个体形态特征

从百部组织中分离到一株产生粘多糖的内生菌株, 编号为 EJS-3。该菌体呈短杆状, 染色均匀、革兰氏染色阳性, 具运动性, 可形成内生孢子, 芽孢囊膨大, 芽孢椭圆形, 中生到次端生。

2.2.2 菌落特征

菌株在 PDA 培养基上呈无色透明菌落, 表面光滑, 凸起, 边缘不整齐, 直径 0.5 ~ 1mm, 菌落粘稠状, 用接种环挑取时呈长长的粘丝状, 不产色素。

2.2.3 生理生化特征

菌株兼性厌氧生长; 其最适生长温度为 28 ~ 30℃, 最低生长温度 10℃、50℃ 以上不能生长; 5% NaCl 条件下不生长; VP 试验阴性; 石蕊牛乳试验, 牛乳凝固但

表1 EJS-3 菌株生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain EJS-3

特征	结果	特征	结果
革兰氏染色	+	柠檬酸盐利用	-
芽孢膨大	+	NaCl 生长	< 5%
氧生长	+	淀粉水解	+
厌氧生长	+	吲哚产生	-
最适生长温度	30	L-阿拉伯糖	+
生长温度范围	10~45	D-木糖	+
VP 实验	-	D-甘露醇	+
牛乳凝固	+	D-葡萄糖	+
牛乳酪化	-	蔗糖	+
凝固酶	+	甘油	+
尿素	-	二羟丙酮	+
硝酸盐还原	+	蛋黄实验	-

不被酪化；能水解淀粉；过氧化氢酶阳性；硝酸盐还原试验阳性；二羟丙酮试验阳性；吲哚试验阴性；不分解尿素；不利用柠檬酸盐；能利用 L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露醇、蔗糖、D-葡萄糖、甘油(见表1)。综合以上培养特征及生理生化特性，根据东秀珠的《常用细菌鉴定手册》，初步将 EJS-3 菌株鉴定为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。

2.3 基于 16S rRNA 基因的分子生物学鉴定

2.3.1 16S rRNA 基因测序结果

以 EJS-3 总 DNA 为模板，利用 16S rRNA 引物进行 PCR 扩增，得到约 1.45kb 的 PCR 扩增产物(电泳图谱见图2)。取 PCR 产物 40 μl，由上海生工生物技术公司完成 16S rRNA 的测序工作。测序结果如下共计 1450bp。此序列在 GenBank 中的登录号为 DQ120522。

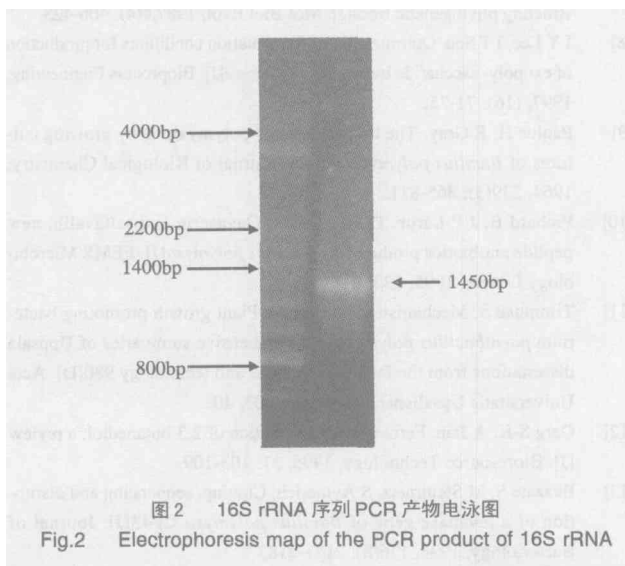


图2 16S rRNA 序列 PCR 产物电泳图

Fig.2 Electrophoresis map of the PCR product of 16S rRNA

2.3.2 BLAST 同源性搜索比较结果

将所得 16S rRNA 测定序列，在 www.ncbi.nlm.nih.

gov 网站中使用 BLASTN 2.2.8 [Jan-05-2005] 在 GenBank + EMBL + DDBJ + PDB 基因库中进行同源性搜索，所得结果中同相似性最高的前 10 个菌株比较结果如表 2。从表 2 可见 EJS-3 菌株与各多粘类芽孢杆菌 16S rRNA 序列相似性均达 98% 以上，最高达 99.3%，而且全部为多粘类芽孢杆菌。初步确定该菌为多粘类芽孢杆菌。

表2 在 GenBank 中同部分菌株 16S rRNA 序列进行同源性比较结果

Table 2 Result of identity compared with partial strains in the GenBank database

菌株名	菌株名	登录号	分值	相似性(%)
多粘类芽孢杆菌	IAM 13419T	AB042063	2763	98.97
多粘类芽孢杆菌	DSM 36T	AJ320493	2763	99.04
多粘类芽孢杆菌	KCTC1663	AY359633	2759	99.31
多粘类芽孢杆菌	WY110	AY302439	2755	98.97
多粘类芽孢杆菌	CECT 5266	AJ271157	2736	98.83
多粘类芽孢杆菌	GBR-477	AY359625	2734	99.17
多粘类芽孢杆菌	KCTC3554	AY359635	2734	99.10
多粘类芽孢杆菌	KCTC1761	AY359634	2734	99.10
多粘类芽孢杆菌	GBR-180	AY359616	2730	99.03
多粘类芽孢杆菌	GBR-182	AY359618	2728	99.00

2.3.3 系统发育树的构建

综合同源性比对结果和多粘类芽孢杆菌在细菌发育系统中位置，从 GenBank 中选择了十七种菌株的 16S rRNA 基因序列，应用 Bioedit 7.0 和 Treedrawing 软件进行多重比较后构建系统发育树，如图 3。结果表明，EJS-3 菌株与多粘类芽孢杆菌的遗传距离比与其它产芽孢杆菌的均小，且 EJS-3 和多粘类芽孢杆菌在一个分支中。由此进一步证明，EJS-3 菌株为多粘类芽孢杆菌。

3 讨论

本研究利用 16S rRNA 基因测序，对一株能产生胞外多糖的植物内生菌 EJS-3 菌株进行了细菌分类学鉴定。通过 16S rRNA 基因序列在 GenBank+EMBL+DDBJ+PDB 基因库中进行同源性比较，发现与该菌株基因相似性为 98% 以上的菌株有 30 多个，它们都为多粘类芽孢杆菌。而且在系统发育树中与多粘类芽孢杆菌属于同一小分支。这一结果与常规的生理生化鉴定结果是一致的。说明本研究的鉴定结果是可靠的。

多粘类芽孢杆菌以能产生多粘菌素而早为人们所熟知^[9]。由于对该菌研究的不断深入，近些年来多粘类芽孢杆菌被用于生物农药^[10]，生物肥料^[11]，1,3-丁二醇^[12]、木聚糖酶和果聚糖的生产^[13]。特别是利用该菌生产的果聚糖在食品工业具有广泛的用途^[14]。尽管多粘类芽孢杆菌为一常规菌种，但来源于植物的内生菌株，有可能具有一些普通菌株所没有的特性。本菌株产胞外多糖的能力较强，这一特性是否与内生菌株有关还有待于

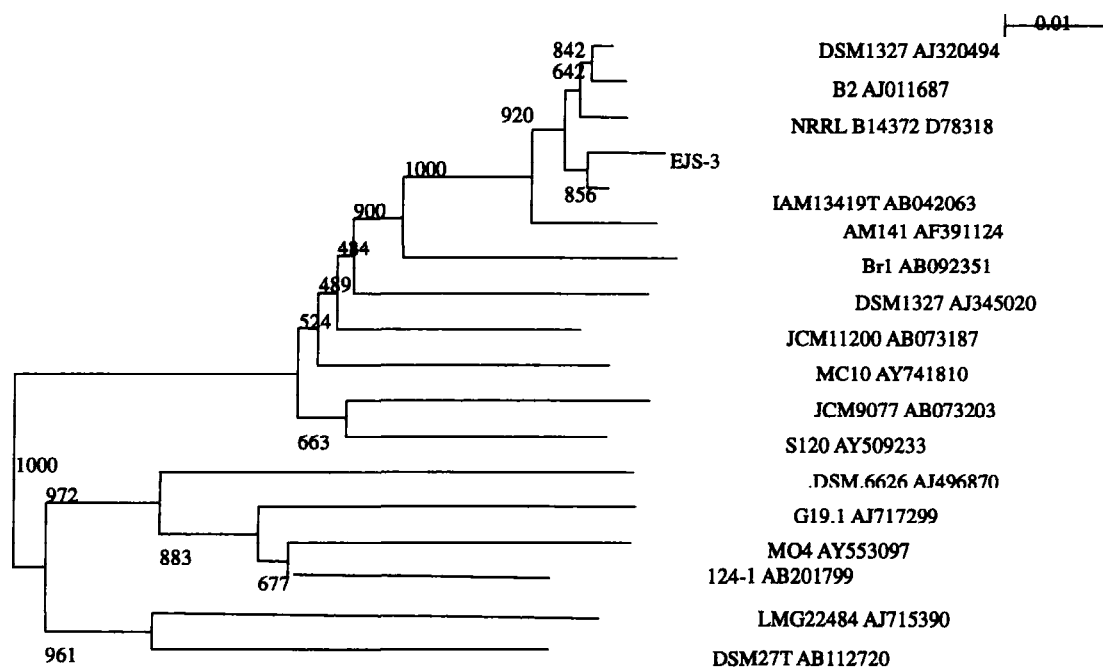


图3 基于16S rRNA序列的系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequence of isolate and sequences of relating species

进一步研究。目前国内对多粘类芽孢杆菌的研究甚少，尚无对产胞外多糖多粘类芽孢杆菌筛选的报道，国外的研究也不多见。Mitsuda 等人^[8]曾利用多粘类芽孢杆菌，114h 产生约 15g/L 胞外多糖；Cox 等^[8]由多粘芽孢杆菌合成的生物高聚物 PS87 产量仅为不到 10g/L；Bezzate 等报道^[14]，利用多粘类芽孢杆菌，在含 8% 蔗糖的培养基上生成的果聚糖产量是其它多糖产生菌的 4 倍。多粘类芽孢杆菌胞外多糖高产菌株的筛选已成为制约其能否应用于工业化生产的决定性因素。本实验从植物根部组织中分离得到一株能产生胞外多糖的植物内生多粘类芽孢杆菌 EJS-3 菌株。此菌株在起初的筛选培养基中就显示出较高的胞外多糖产量，经选择更合适的产糖培养基发酵后，胞外多糖的产量达到 23.6g/L，转化率为 47.2% (g EPS/g 蔗糖)。这一高产特性，显示了在生产实际中有很好的应用潜力，值得作进一步研究。另外，植物来源的内生多粘类芽孢杆菌产生的胞外多糖有何特性，其分子结构组成如何等，也有待进一步研究。

参考文献：

- [1] 魏培莲. 微生物胞外多糖研究进展[J]. 浙江科技学院学报, 2002, 14(2):8-14.
- [2] I W Sutherland. Novel and established applications of microbial polysaccharide[J]. TIBTECH, 1998, 16(1): 41-46.
- [3] 宋绍富, 崔吉. 微生物多糖研究进展[J]. 油田化学, 2004, 21(1): 91-95.
- [4] G A Strobel. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes Infect, 2003, 5(6): 535-544.
- [5] 东秀珠, 蔡妙瑛. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [6] Sambrook J, Russel D W. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] Naruya Saitou. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406-425.
- [8] I Y Lee, I T Seo. Optimization of fermentation conditions for production of exopolysaccharide by *Bacillus polymyxa*[J]. Bioprocess Engineering, 1997, (16): 71-75.
- [9] Paulus H, E Gray. The biosynthesis of polymyxin B by growing cultures of *Bacillus polymyxa*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1964, 239(3): 865-871.
- [10] Pichard B, J P Larue, D Thouvenot. Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 133: 215-218.
- [11] Timusk S. Mechanism of action the Plant growth promoting bacterium *paenibacillus polymyxa*. Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the faculty of science and technology 980[D]. Acta Universitatis Upsalensis, Uppsala, 2003, 40.
- [12] Garg S-K, A Jain. Fermentative production of 2,3-butanediol: a review [J]. Bioresource Technology, 1995, 51: 103-109.
- [13] Bezzate S, M Steinrnetz, S Aymerich. Cloning, sequencing and disruption of a levanase gene of *Bacillus polymyxa* CF43[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(8): 2177-2183.
- [14] Han YW. Levan production by *Bacillus polymyxa*[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1989, (4): 447-452.