

# 一株动性杆菌的生理学特性研究及其鉴定

李建辉, 路盼盼, 张亚平

(石河子大学 生命科学院, 新疆 石河子 832003)

**摘 要:**从新疆泥火山样品中分离得到 1 株细菌 ljh-5, 经过 16S rDNA 分子鉴定, 该菌株与动性杆菌属(*Planomicrobium*)的相似度最高为 90%, 结合菌株、菌落特征及其生理生化特性, 初步鉴定该菌为动性杆菌属新种。并对该菌株生长特性进行研究。

**关键词:**动性杆菌; 泥火山; 16S rRNA; 生理生化

**中图分类号:**Q 937 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0165-03

动性杆菌或球菌通常为革兰氏阳性, 该菌具有产脂肪酶的特殊功能, 广泛分布于海洋或石油富集区<sup>[1]</sup>, 1894 年 Migula<sup>[2]</sup> 首先发现动性球菌 (*Planococcus*); 朱颖旻等<sup>[3]</sup> 在 2009 年发现 1 株动性球菌 ZOYM, 它具有很强的降解油脂的能力。脂肪酶被广泛应用于生物柴油、生物化工、环保及医疗等诸多方面<sup>[4]</sup>。但目前国内使用的脂肪酶多依赖进口<sup>[5]</sup>, 因此对动性杆/球菌的深入研究, 有助于实现国内资源的需求, 具有重大现实意义。该研究从新疆泥火山泥浆水中分离获得 1 株动性杆菌, 对其形态、生长特性生理生化特征及 16S rRNA 进行了分析。为进一步应用研究提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验菌株

动性杆菌 ljh-5 从新疆乌苏泥火山泥浆水中分离获得。

### 1.2 菌株培养特征、生理生化特征及生长特性测定

参考文献[6]中的方法。

### 1.3 菌株 16S rRNA 分析

#### 1.3.1 细菌 DNA 提取 参考文献[7]中的方法。

#### 1.3.2 16S rDNA 的 PCR 扩增 扩增所用引物为细菌通用引物 27F/1492R, 扩增体系及循环参见文献[8]。

#### 1.3.3 序列分析 将测得的 16S rDNA 序列进行 Blast 同源性搜索, 利用 DNASTar 和 ClustalX 1.8 软件进行格式转化, 使用 phylip 3.65 软件(N-J 法)构建系统进化树。经 bootstrap 法 1 000 次循环检验系统树可靠性。

**第一作者简介:**李建辉(1984-), 男, 山西运城人, 在读硕士, 研究方向为发酵工程。E-mail: lijianhui1511@sina.com。

**通讯作者:**张亚平(1964-), 女, 硕士, 教授, 研究方向为功能微生物。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30860001)。

**收稿日期:**2010-05-06

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株形态及生理生化特征

菌株 ljh-5 可以在 LB 培养基上生长单菌落特征为:

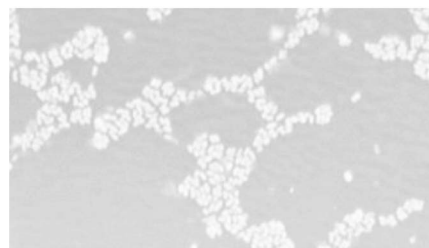


图 1 光学显微镜下 ljh-5 菌体形态(10×100)

表 1 生理生化反应

特征	结果
葡萄糖	—
乳糖	—
麦芽糖	—
蔗糖	—
甘露糖	—
乙醇	—
脂酶	—
甲基红	—
淀粉水解	—
硝酸盐还原	—
吲哚	—
明胶水解	+
VP	—
H <sub>2</sub> S	—
接触酶	+
柠檬酸钠	—
耐盐性/%	
NaCl 0.5	++
NaCl 3	+
NaCl 5	+
NaCl 7	++
NaCl 10	++
NaCl 15	—

注: +, 阳性 Positive; —, 阴性 Negative。耐盐实验: +, 培养基少浑浊; ++, 培养基重度浑浊; —, 培养基透明。

菌落呈圆形,乳脂色,表面光滑,不透明,边缘整齐,不产色素。染色后,在显微镜下观察菌体形态(图 1)特征如下:革兰氏阳性,细胞呈短杆状,无芽孢、荚膜,端生鞭毛,运动性良好,大小为  $1\ \mu\text{m}\times 1.3\sim 1.6\ \mu\text{m}$  左右。

菌株 ljh-5 的生理生化结果见表 1,接触酶阳性,可水解明胶,硝酸还原、柠檬酸盐反应阴性,不可利用葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、麦芽糖等发酵产酸。

结合其它生理生化特征及形态特征,参照文献[6]初步鉴定 ljh-5 为动性杆菌属。

## 2.2 菌株生长特性

通过温度梯度及 pH 梯度试验,从图 2、3 中可以看

出, ljh-5 菌株最适温度为  $33^{\circ}\text{C}$  左右,最适 pH 8.0 左右。在最适温度与最适 pH 的条件下,获得菌株生长曲线如图 4,从中可以看出,0~72 h 为 ljh-5 菌株的延至期,72~144 h 为对数生长期,144~156 h 为稳定期,156 h 后为衰退期。从生长曲线整体看,该菌属生长缓慢性菌株。

## 2.3 序列分析

2.3.1 菌株的 16S rDNA 全序列 ljh-5 菌株的序列全长为 1 455 bp(表 2)。NCBI 收录 NO:GU332501,命名为: *Planomicrobium* sp. ljh-5。

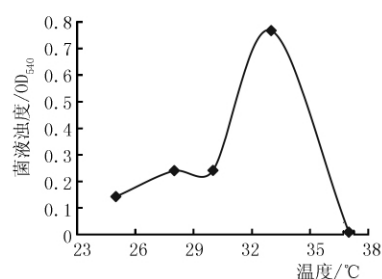


图 2 不同温度对菌株生长的影响

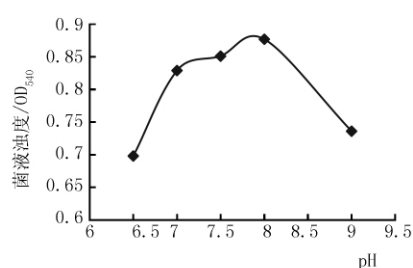


图 3 不同 pH 对菌株生长影响

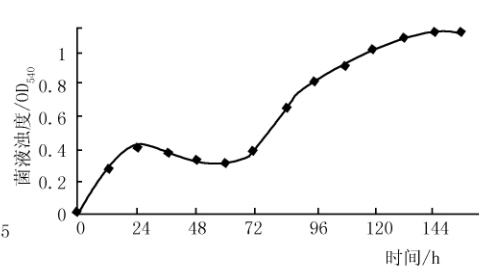


图 4 ljh-5 菌株生长曲线

表 2

16S rDNA 全序列

1	TGATTGCTCG	TGCTATACAT	GCAGTCGAGC	GGAACCTTGG	AGCTTGCTCC	TTTTGGTTTA
61	CGGCCGAACG	GTTGAGTAAC	ACGGGGGCAA	CCTGCCTGGC	AAATCGGATT	AACTCCGAA
121	AACCGTGGCT	ATTACGAAT	AGTTAATAAC	CTCTCCGAG	GTTATACGGA	AAGACGTTT
181	CGGTGTGAC	TGCAGGATGG	GCCCGCGGCG	CATTACTTAG	TTGGGGGGGT	AACGGCCAC
241	CAAGGCAACA	ATGCGTACCC	AACCTGAAAG	GTGGATCGGC	CACACGGGAA	CTGAAACACG
301	GCCAAACTC	CTACGGAAGG	CAGCAGTAGG	AAATCTTCCG	CATGGAACCC	AGGTCTGACG
361	AACCACCCC	CCGGGAGTGA	CAAAGGTTTT	CGAATCGAAA	AATCTGTGTG	GGAGGAAAAA
421	ACAATTACCA	CTTAACACG	GGTACCTTGA	CGGTACCTCA	CCAAAAGCC	ACGGTTAATT
481	ACTGGCCACC	ACCCGCGGTA	TTACTTAGGT	GGCAGGCGTT	GTCCGAAATT	ATGGGCGGTA
541	AAGCGGCGC	AGGCGGCCCC	TTAATCTTAA	TGTGAAAGCC	CACGGTTCAC	CGTGGAAGGG
601	TCATTGAAAA	CTGGGGAAC	GGATGCAAAA	GAAGGAAGTT	GAAATTCGCC	TTGTACCGTG
661	GAATGGCTTA	AAGAGGTGAA	GAACCACCAG	TGCCGAAGGC	AACTTTCTGG	TCTGTAAC
721	ACGCTGAGGC	GCGAAAGCGT	GGGAGGCAAA	CAGGATTAGA	TACCTTGTA	GTTCACGCCG
781	TAAACGATGA	GTGCTAAGTG	TTAGGGGGTT	TCCGCCCTT	AGTGCTGCAG	CTAACGCATT
841	AAGCACTTCG	CCTGGGGAGT	ACGGCCGCAA	GGCTGAAACT	CAAAGGAATT	GACGGGGGCC
901	CGCACAAGCG	GTGGAGCATG	TGGTTTAATT	TGAAGCAACG	CGAAGAACCT	TACCAGGTCT
961	TGACATCCCG	CTGCCCCCT	AGGAGACTAG	GCTTTCCCTT	TGGGGACAGC	GGTGACAGGT
1021	GGTGCATGGT	TGTTGTGAGC	TCGTGTGCTG	AGATGTTGGG	TTAAGTTCCG	CAACGAGCGC
1081	AACCTTGAT	TTTAGTTGCC	AGCCTTCAGT	TGGGCCCTTT	AAGGTGACTG	CCGGTGACAA
1141	ACCGGAGGAA	GGTGGGGAAG	ACGTCAAATC	ATCATGCCCC	TTATGACCTG	GGCTACACAC
1201	GTGCTACAAT	GGACGGTACA	AAGGGCTGCA	AAACCGCGAG	GGGGAGCCAA	TTCCAGAAAA
1261	CCGTTTTTCAG	TTTGGAATG	AGGCTGCAAC	TTGCCTGCAT	GAAGCCGGAA	TCGCTAGTAA
1321	TCGTGGATCA	GCATGCCCCG	GTGAATACGT	TCCCGGGCCT	TGTACACCCC	CCCCGTCACC
1381	CCCCGAGAGT	TTGTAACCCC	CGAAGTCGGT	GAGGTAACCA	CTTGTGGAGC	CAGCCGCCGA
1441	AGTGGACAGA	TTTTT				

2.3.2 同源性分析 将 ljh-5 菌株的 16S rDNA 序列在 NCBI 中提交进行 BLAST 同源性搜索,结果发现该序列与动性杆/球菌属各个种间的同源关系较近,如 ljh-5 菌株与 *Planomicrobium chinense* DX3 (NO: AJ697862)、*Planomicrobium k. s.* WT024(NO: GQ152129)、*Planococcus sp.* 1~15(NO: AJ781718)在同源树上归为 1 支(表 5),相似度均为 90%,这表明研究菌株与已发表的 16S rDNA 序列同源性较低,按照同源性小于 95%,则属于不同属的原则<sup>[9]</sup>,初步判断 ljh-5 菌株属于一新物种。

从表 5 中可以看出,进化树主要分为 3 支:其中 1 支主要为未知克隆,包括 *Ubc.* 1103200821980 (NO: EU844939)、*Ubc.* 1103200828546 (NO: EU845366)、*Ubc.* 1103200832268 (NO: EU845612)、*Ubc.* 1103200828826 (NO: EU845438);第 2 支为动性球菌属,包括 *Planococcus sp.* YIM C738(NO: EU135677)和 *Planococcus psychrotoleratus*(NO: AF324659);剩下的归为第 3 支,主要为动性杆菌属,其中包括 2 株动性球菌, *Planococcus sp.* 1~15 (NO: AJ781718) 和 *Planococcus sp.* EP36 (NO: AM403727)。动性球菌和杆菌主要是一些培养特征的差异,因此同源关系较近<sup>[6]</sup>。

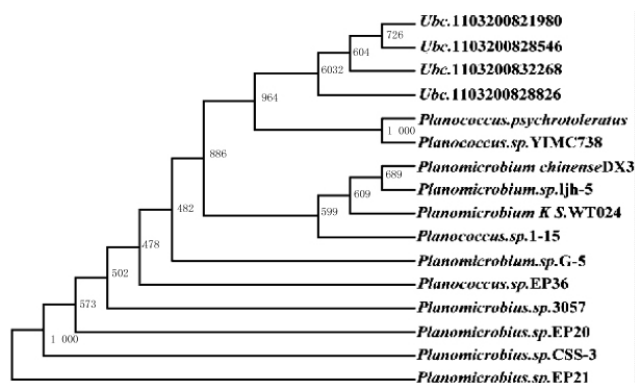


图 5 16S rDNA 序列系统发育树

### 3 结论与讨论

通过常规培养发现, ljh-5 菌株的培养特征及生理生

化特征与文献[6]中所描述的动性杆菌的特征较相似,初步鉴定 ljh-5 菌株为动性杆菌属。而利用 16S rDNA 分子鉴定分析发现,该菌与已发表的 16S rDNA 序列同源性较低,关系最近的为 *Planomicrobium chinense* DX3,相似度为 90%,根据菌属同源性鉴定原则<sup>[9]</sup>,分析该菌株为新菌种。试验还进一步测定了菌株的最适生长温度、pH 及生长曲线,为菌株的进一步应用研究打下基础。

16S rDNA 分子鉴定只能初步确定该细菌的种属地位,要想进一步确定 ljh-5 菌株确切分类地位,还需要进行 DNA-DNA 杂交试验进一步分析<sup>[8]</sup>。

新疆有亚洲最大面积的泥火山分布,在地下天然气和石油矿藏丰富区域的泥火山这一独特的生境中,蕴育了丰富的微生物资源。该试验分离获得 1 株动性杆菌新种,据前人记载<sup>[3]</sup>,动性杆菌具有产脂肪酶的特殊功能,因此研究该菌的生长特性及菌株的分类地位,为进一步的潜在的应用研究提供理论基础。

### 参考文献

- [1] Labuzek S, Hupert-Kocurek K T, Skurnik M. Isolation and characterization of new *Planococcus sp.* strain able for aromatic hydrocarbons degradation [J]. Acta Microbiol Pol, 2003, 52(4): 395-404.
- [2] Migula W. Über ein neues system der bakterien [J]. Arb Bakteriell Inst Karlsruhe, 1894(1): 235-238.
- [3] 朱颖旻, 许铭翻, 刘庆华, 等. 一株动性球菌 ZOYM 的初步鉴定及其内源性质粒 pPCZ1 和 pPCZ2 的分析 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(9): 1294-1298.
- [4] 李维琳, 磷脂酶 A2 的应用 [J]. 生命的化学, 2002, 22(1): 67-69.
- [5] YANG Bo, ZHOU Rong, Yang Ji-guo, et al. Insight into the Enzymatic Degumming Process of Soybean Oil [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2008, 85: 421-425.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常用细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [7] 林万明. 分析微生物学专辑 [M]. 北京: 科学出版社, 1988: 88-89.
- [8] 曾静, 窦岳坦, 王磊, 等. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌 16S rDNA 全序列及 DNA 同源性分析 [J]. 微生物学报, 2002, 4(2): 133-137.
- [9] 邓小玲, 柯碧霞, 柯昌文, 等. 16S rDNA 测序鉴定  $\beta$  溶血性 G 群链球菌 [J]. 四川大学学报(医学版), 2007, 38(6): 999-1001.

## Studies on Physiological Characteristics and Identification of A *Planomicrobium*

LI Jian-hui, LU Pan-pan, ZHANG Ya-ping

(College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

**Abstract:** The strain of ljh-5 was isolated from the mud volcano in Xinjiang, with molecular identification of the 16S rDNA, the highest similarity between the strain and *Planococcus* was 90%. Combining with the characteristics of strain and colony, physiological and biochemical characteristics. The strain was identified primarily as a new species of *Planomicrobium*. Also the growth characteristics of the strains was studied.

**Key words:** *Planomicrobium*; mud volcano; 16S rDNA; physiology and biochemistry