

一株产脂肪酶芽胞杆菌菌株 SJXYZ 的鉴定

陈亮¹, 陈明霞^{1*}, 李和阳² (1. 华侨大学化工学院, 福建厦门 361021; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建厦门 361005)

摘要 [目的] 对分离自市售高温灭菌牛奶的产脂肪酶菌株 SJXYZ 进行鉴定。[方法] 通过 16S rRNA 基因序列及系统发育树分析、形态观察和生理生化特性分析, 对菌株 SJXYZ 生物学特性进行初步鉴定。[结果] 16S rRNA 基因序列分析显示该菌株属于芽胞杆菌属(*Bacillus*), 与 *B. altitudinis* 41KF2b^T (高地芽胞杆菌)、*B. xiamenensis* HYC-10^T (厦门芽胞杆菌)、*B. safensis* FO-36b^T (沙福芽胞杆菌)、*B. zhangzhouensis* DW5-4^T (漳州芽胞杆菌)、*B. australimaris* NH71-1^T (南海芽胞杆菌) 和 *B. pumilus* ATCC 7061^T (短小芽胞杆菌) 相似度皆为 97% 以上。系统发育分析显示, 该菌株与 *B. altitudinis* 41KF2b^T 亲缘关系最近, 但形成独立的进化分支, 无法归入已知物种。菌株 SJXYZ 为革兰氏阳性, 直杆状, 运动性, 最适温度为 30~35℃, 适宜 pH 为 5~9, 适宜盐度 (NaCl) 为 0%~5%; 产脂肪酶, 不产纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶; 对氨苄西林 (10 μg)、庆大霉素 (10 μg)、氟哌酸 (10 μg)、头孢唑啉 (30 μg)、四环素 (30 μg)、头孢噻吩 (30 μg)、链霉素 (10 μg) 敏感。所测特性与 *B. altitudinis* 41KF2b^T 有较大的差异。[结论] 菌株 SJXYZ 可能为新的物种, 暂命名为 *Bacillus* sp. SJXYZ。

关键词 芽胞杆菌; 菌种鉴定; 脂肪酶

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)08-0108-02

Identification of a Lipase-producing *Bacillus* sp. SJXYZ

CHEN Liang¹, CHEN Ming-xia¹, LI He-yang² (1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen, Fujian 361021; 2. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, Fujian 361005)

Abstract [Objective] To identify strain SJXYZ, which was isolated from commercial sterilized milk. [Method] Strain SJXYZ was characterized by morphological, biochemical and physiological tests, 16S rRNA gene sequence determination and phylogenetic analyses. [Result] 16S rRNA gene analysis indicated that strain SJXYZ belonged to the genus *Bacillus* and had small higher than 97% similarity to *B. altitudinis* 41KF2b^T, *B. xiamenensis* HYC-10^T, *B. safensis* FO-36b^T, *B. zhangzhouensis* DW5-4^T, *B. australimaris* NH71-1^T and *B. pumilus* ATCC 7061^T. The phylogenetic analysis showed that strain SJXYZ was closest to *B. altitudinis* 41KF2b^T, but formed an independent branch separated from all the reference strains. Cells were gram-stain-positive, straight rod, motile. Growth occurred at pH 5-9, at 0%-5% NaCl, and with optimum temperature at 30-35℃. Lipase was passive. Proteinase, cellulase and amylase were negative. Sensitive to ampicillin (10 μg), gentamycin (10 μg), norxacin (10 μg), cefazolin (30 μg), tetracycline (30 μg), cephalothin (30 μg) and streptomycin (10 μg). Genomic and phenotypic data of strain SJXYZ shew a big difference from *B. altitudinis* 41KF2b^T. [Conclusion] On the basis of these findings, we propose that strain SJXYZ represents a new species of *Bacillus* for which we propose the name *Bacillus* sp. SJXYZ.

Key words *Bacillus*; Identification; Lipase

芽胞杆菌 (*Bacillus*) 是一类革兰氏阳性菌, 产芽胞, 需氧或兼性厌氧, 大多数有动力, 无荚膜, 广泛存在于土壤、水、空气以及动物肠道等各类生境中^[1-5], 在生产、生活及环境生态中扮演着重要角色。该属种类繁多, 目前有效命名的种类有 357 种 (<https://www.dsmz.de/bacterial-diversity/prokaryotic-nomenclature-up-to-date/prokaryotic-nomenclature-up-to-date.html>), 有的具有致病性, 比如可引起人及动物致病的 *B. anthracis* (炭疽芽胞杆菌) 和引起食物中毒的 *B. cereus* (蜡状芽胞杆菌); 有的可作为益生菌, 比如 *B. coagulans* (凝结芽胞杆菌)、*B. lentus* (缓慢芽胞杆菌)、*B. subtilis* (枯草芽胞杆菌)、*B. pumilus* (短小芽胞杆菌) 和 *B. licheniformis* (地衣芽胞杆菌), 这些益生菌在动物肠道中生长繁殖的同时会产生一些活性物质 (如枯草菌素、有机酸等), 能抑制和杀死肠道病原菌, 促进营养物质的消化、吸收, 抑制肠源性毒素的产生和吸收, 从而调节和维持动物消化道微生物区系的平衡; 有的可作为微生物农药, 比如 *B. thuringiensis* (苏云金芽胞杆菌) 可用于防治直翅目、鞘翅目、双翅目、膜翅目的多种害虫^[6]; 多数芽胞杆菌属细菌可以产生种类繁多的工业用酶, 比如工业

用的高温淀粉酶主要是由 *B. licheniformis* 生产的、*B. alkalophilic* (嗜碱芽胞杆菌) 是碱性纤维素酶的主要生产菌株、*B. subtilis* (枯草芽胞杆菌) 是蛋白酶的主要生产菌株^[7]。笔者从市售高压灭菌的纯牛奶中分离一株未知菌株 SJXYZ, 其菌落呈树枝状且产生脂肪酶, 该研究对此进行初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌株培养 菌株 SJXYZ 分离自市售高压灭菌的纯牛奶, 其培养基为 LB 培养基, 25~30℃ 培养。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 菌株 16S rRNA 基因序列及系统发育学分析。 细菌总 DNA 采用细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒 (B518225, 上海生工) 进行提取, 16S rRNA 基因片段的扩增方法参考文献 [8]。菌株 16S rRNA 基因序列由南京金斯特生物技术有限公司测定, 所得序列校正后在 EzBioCloud 数据库比对分析并获取相近菌种的 16S rRNA 基因序列。利用 DNAMAN (version 5.1, Lynnon BioSoft) 软件进行序列同源性分析及构建 16S rRNA 基因系统进化树。

1.2.2 形态及生理生化特性鉴定。 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[9] 的方法, 进行培养和部分生理生化特征的测定。

2 结果与分析

2.1 菌株 SJXYZ 16S rRNA 基因序列及系统发育分析 测序得到 16S rRNA 基因序列长度为 1 133 bp, 已提交 GeneBank 数据库, 序列号为 HM371427。通过 EzBioCloud 数据库比对分析表明: 菌株 SJXYZ 与 *B. altitudinis* 41KF2b^T、*B. xiam-*

基金项目 国家自然科学基金项目 (41506179); 福建省自然科学基金项目 (2015J01613); “全球变化与海气相互作用”专项 (GASI-03-01-03-01, GASI-03-01-03-02); 华侨大学高层次人才科研启动项目 (12BS206)。

作者简介 陈亮 (1987—), 男, 湖北汉川人, 从事微生物鉴定研究。* 通讯作者, 讲师, 博士, 从事海洋微生物资源研究。

收稿日期 2018-01-10

ensis HYC - 10^T、*B. safensis* FO - 36b^T、*B. zhangzhouensis* DW5 - 4^T、*B. australimaris* NH71_1^T 和 *B. pumilus* ATCC 7061^T 相似度皆为 97% 以上。在此基础上,在 EzBioCloud 数据库寻找 *Bacillus* 属的相关序列,并构建相应的系统发育树(图 1)。从系统发育树中可以看出菌株 SJXYZ 与 *B. altitudinis* 41KF2b^T 的亲缘关系最近,但处在一个完全独立的进化分支

上。在该进化树上可以明显发现菌株 SJXYZ 的近源种之间的进化距离较小,菌株 SJXYZ 与所有近源种之间的距离大于种间距离,无法归为任何一个已知物种。根据 Drancourt 等^[10-11] 提出 16S rRNA 基因序列同源性鉴定规则,初步将菌株 SJXYZ 归为 *Bacillus* 属,命名为 *Bacillus* sp. SJXYZ。

2.2 菌株 SJXYZ 菌落及个体形态 菌株 SJXYZ 在 LB 平

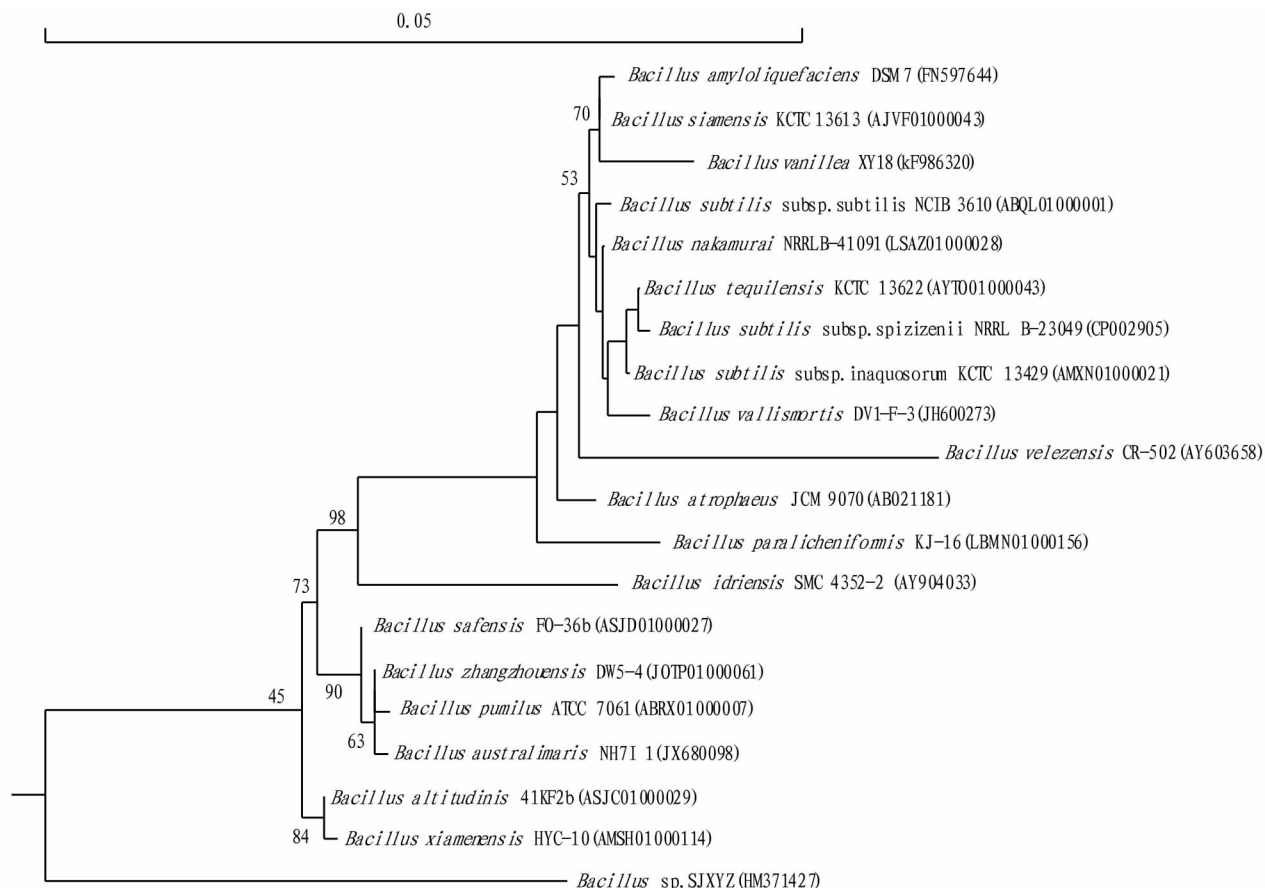


图 1 根据 16S rRNA 基因序列构建菌株 SJXYZ 系统发育进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain SJXYZ based on bacterial 16S rRNA gene

板上于 30℃ 培养 48 h 后,菌落为白色,菌落呈扩散性生长,边缘呈现树枝状或羽毛状,菌落初始光滑、湿润,后期则干燥或形成皱褶,不透明,无金属光泽,易挑取。菌体为革兰氏阳性,产芽胞,无荚膜,具有运动性,直杆状,大小约 1.1 μm × 4.2 μm。

2.3 菌株 SJXYZ 生理生化特性 菌株 SJXYZ 适宜盐度 (NaCl) 为 0% ~ 5%, 在 10% 的 NaCl 下基本不生长;适宜 pH 为 5 ~ 9, 在 pH 4 和 10 下菌株基本不生长;最适温度为 30 ~ 35℃。氧化酶、过氧化氢酶及脂肪酶阳性,淀粉酶、蛋白酶及纤维素酶阴性。对氨苄西林 (10 μg)、庆大霉素 (10 μg)、氟哌酸 (10 μg)、头孢唑啉 (30 μg)、四环素 (30 μg)、头孢噻吩 (30 μg)、链霉素 (10 μg) 敏感。

3 讨论

16S rRNA 基因序列同源性分析在细菌的分类鉴定中具有非常重要的作用,一般将同源性高于 95% 的细菌归为同一个属,同源性高于 97% 或 98% 的细菌归为同一个种^[10-11]。近年来,研究发现芽胞杆菌属细菌的 16S rRNA 基因序列同源性普遍偏高,相近种之间很难通过 16S rRNA 基因序列的

同源性进行区分^[12-13]。Liu 等^[13] 对 1 007 个芽胞杆菌属菌株的 16S rRNA 基因序列进行种间、种内及菌株间 3 个水平统计分析,发现该属细菌种内及菌株内的 16S rRNA 同源性为 99.14% ~ 100%, 而种间同源性为 97.34% ~ 100%, 相近种之间极易混淆。菌株 SJXYZ 与最近种 *B. altitudinis* 41KF2b^T 的 16S rRNA 基因序列同源性为 97.96%, 两者的生理生化特性也有较大差异:*B. altitudinis* 41KF2b^T 蛋白酶、淀粉酶阳性,脂肪酶阴性,在 pH 5 条件下不生长,对氨苄西林、氟哌酸、头孢唑啉有抗性,而菌株 SJXYZ 刚好相反。综上所述,菌株 *Bacillus* sp. SJXYZ 极有可能是芽胞杆菌属内的一个全新的物种,后续需要通过更加全面的系统鉴定以确定其分类地位,包括 DNA - DNA 同源性、G + C 含量 (mol%)、ANI (平均核苷酸同源性)、脂肪酸组分分析和醌组分分析等一系列生理生化及分子方面指标的测定。此外,菌株 SJXYZ 分离自高温灭菌的市售牛奶,其存在可能与牛奶的保质期直接相关,也警示着牛奶加工产业灭菌工艺有待完善。

(下转第 117 页)

染主要是由降雨径流产生,特别是在暴雨初期,污染物浓度一般都远超平时污水浓度,这就导致被污染的水资源流进各种池塘、湖泊、河流和湿地都要经过污水净化处理才能进一步循环利用^[7],而水生植物不仅可以丰富水体景观,更可以净化水质。研究表明,大多数水生植物都具有良好的水质生态净化功能,如黄花鸢尾对水体中的总氮和硝酸盐类有吸附作用,并且可以有效去除水体中的叶绿素,抑制藻类的繁殖和生长;香根草对富营养化水体中的氮、磷等具有明显的去除效果,能有效改变水体的富营养化。

桂林是座多河流湖泊的城市,可以建设成具有丰富水生植物的水体景观城市,这不仅能提升城市的景观效果,对于污水的调节和净化同样具有非常重大的意义。对于水生植物的分类,可以根据其生活习性和生态环境分为4类,分别是挺水植物、浮叶植物、漂浮植物和沉水植物^[8]。一个湿地系统若想达到净化污水的功能,这4类型的植物缺一不可。挺水植物是根系生长于水底的泥土之中,茎叶挺出水面,此类植物可以吸收污水中过剩的金属离子等,如芦苇(*Phragmites australis*)、莲(*Nelumbo nucifera*)、菖蒲(*Acorus calamus*)、慈姑(*Sagittaria trifolia*)、雨久花(*Monochoria korsakowii*)、再力花(*Thalia dealbata*)、香蒲(*Typha orientalis*)、旱伞草(*Cyperus alternifolius*)、千屈菜(*Lythrum salicaria*)等;浮叶植物是指叶漂浮于水面或稍高于水面,根生于泥土,茎细弱不能直立,如睡莲(*Nymphaea tetragona*)、荇菜(*Nymphoides peltatum*)、菱(*Trapa bispinosa*)、莼菜(*Brasenia schreberi*)、芡实(*Euryale ferox*)等;漂浮植物是指自然漂浮于水面生长,在水面位置不受控制,水流向哪里就飘向哪里,此类植物有很好的污水净化能力,特别是吸附水中过剩的营养元素,但也易繁殖泛滥,应

加以约束,如凤眼蓝(*Eichhornia crassipes*)、浮萍(*Lemna minor*)、紫萍(*Spirodela polyrrhiza*)、满江红(*Azolla imbricate*)、大藻(*Pistia stratiotes*)等;沉水植物是指整个植物生长于水面以下,在水下通过光合作用释放氧气,如金鱼藻(*Ceratophyllum demersum*)、黑藻(*Hydrilla verticillata*)、狐尾藻(*Myriophyllum verticillatum*)、苦草(*Vallisneria natans*)等。

3 结语

海绵城市建设虽然任务艰巨,但可造福于子孙后代,不管多么艰巨也应该坚持下去。对于怎样建设一个集蓄水、净化、景观功能于一体的园林系统工程,需要认真对待;怎样搭配建造一个稳定、适用、美观、协调的园林绿化植物景观,更需要认真思考。桂林是一个植物种质资源非常丰富的地区,希望能充分利用自身优质资源并结合海绵城市理念和相关标准规范,以最少、最科学的投入来建设功能最大化的园林城市。

参考文献

- [1] 仇保兴. 海绵城市(LID)的内涵、途径与展望[J]. 建设科技, 2015(1): 11-18.
- [2] 王文亮, 李俊奇, 王二松, 等. 海绵城市建设要点简析[J]. 建设科技, 2015(1): 19-21.
- [3] 苏文敬, 王思思, 车伍, 等. 基于“海绵城市”理念的下沉式绿地优化设计分析[J]. 南方建筑, 2014(3): 39-43.
- [4] 桂林市园林管理局. 桂林市志·园林志[M]. 桂林: 桂林市园林管理局, 1995: 29-32.
- [5] 万静. 屋顶绿化新技术与城市雨水利用[J]. 技术与市场(园林工程), 2005(7): 22-25.
- [6] 赵慧. 屋顶花园的设计原则与植物配置探讨[J]. 现代商贸工业, 2010(24): 379-380.
- [7] 解静静. 谈海绵城市建设的必要性[J]. 山西建筑, 2015, 41(25): 194-195.
- [8] 黄珂, 吴铁明, 吴哲, 等. 水生植物在园林中的应用现状初探[J]. 林业调查规划, 2005, 30(5): 94-97.
- [9] NAVON A. *Bacillus thuringiensis*, application in agriculture. Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application [M]. Netherlands: Springer, 2000.
- [10] 刘国红, 林乃铨, 林营志, 等. 芽孢杆菌分类与应用研究进展[J]. 福建农业学报, 2008, 23(1): 92-99.
- [11] DELONG E F. Archaea in coastal marine environments [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 1992, 89(12): 5685-5689.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] DRANCOURT M, BOLLET C, CARLIOZ A, et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates [J]. Journal of clinical microbiology, 2000, 38(10): 3623-3630.
- [14] DRANCOURT M, BERGER P, RAOULT D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans [J]. Journal of clinical microbiology, 2004, 42(5): 2197-2202.
- [15] LIU Y, LAI Q L, DU J, et al. Reclassification of *Bacillus invictae* as a later heterotypic synonym of *Bacillus altitudinis* [J]. International journal of systematic & evolutionary microbiology, 2015, 65(8): 2769-2773.
- [16] LIU Y, LAI Q L, CÖKER M, et al. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group [J]. Scientific reports, 2015, 5: 14082.
- [17] LIU Y, LAI Q, DU J, et al. *Bacillus zhangzhouensis* sp. nov. and *Bacillus australimaris* sp. nov. [J]. International journal of systematic & evolutionary microbiology, 2016, 66(3): 1193-1199.
- [18] SHIVAJI S, CHATURVEDI P, SURESH K, et al. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes [J]. International journal of systematic & evolutionary microbiology, 2006, 56(Pt 7): 1465-1473.
- [19] LEE J B, JEON S H, CHOI S G, et al. *Bacillus piscis* sp. nov., a novel bacterium isolated from the muscle of the antarctic fish *Dissostichus mawsoni* [J]. Journal of microbiology, 2016, 54(12): 809-813.
- [20] NIU L J, XIONG M J, ZHANG J, et al. *Bacillus camelliae* sp. nov., isolated from Pu'er tea [J/OL]. International journal of systematic & evolutionary microbiology, 2018 [2017-12-18]. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002542>.
- [21] SECH E H, BEYE M, TRAORE S I, et al. *Bacillus kwashiorkori* sp. nov., a new bacterial species isolated from a malnourished child using culturomics [J/OL]. Microbiology open, 2017 [2017-12-18]. <https://doi.org/10.1002/mbio.3.535>.

(上接第109页)

参考文献