

一个产木质素酶的嗜碱细菌新种

赵大鹏 张伟周 薛燕芬 马延和*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要: 从内蒙古盐碱湖分离到一株产木质素酶的嗜盐碱菌 F10。其形态为杆状或短杆状,革兰氏染色阳性,最适生长 pH 为 9.5,最适生长温度为 37℃。通过生理生化特征、胞壁氨基酸成分、基于 16S rDNA 序列的系统发育学分析和 DNA-DNA 杂交同源性比较发现菌株 F10 是双芽孢杆菌(*Amphibacillus*) 属中一个与其它成员不同的新种,命名为好纪双芽孢杆菌 *Amphibacillus haojiensis* sp. nov.。

关键词: 嗜碱细菌 好纪双芽孢杆菌 多相分类

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2004)06-0720-04

木质素是木质植物的主要组成成分,是仅次于纤维素的第二再生有机资源,并且也是生物圈中最丰富的芳香类化合物。越来越多的证据表明微生物降解木质素日益成为木质素利用的有效方法。在真菌和细菌中均已发现可产生木质素酶以降解木质素的菌种。尽管目前的研究集中在以黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) 为代表的白腐真菌产生的木质素酶上,但由于木质素具有强烈的抗酸解性,且不溶于水和中性有机溶剂,而在碱性条件下具有一定的可溶性,因此在工业应用中木质素的化学处理通常是在强碱的条件下进行,而在这样的条件下真菌产生的木质素酶大部分不能发挥作用。较理想的木质素酶应是能在碱性条件下降解木质素,这样可以结合有利于降解木质素的化学特性和生物特性,获得降解木质素的最佳效果。目前关于嗜碱菌产生木质素酶的报道还很少^[1]。

本实验从内蒙古海拉尔地区的好纪湖中反复分离,筛选到 5 株产木质素酶的菌株,其中 F10 能够在 pH 7~10.5 下生长并且在这样的生长环境下分泌碱性木质素酶。通过形态学、生理生化特征、化学分类、分子分类相结合的多项分类方法,鉴定菌株 F10 是不同于已报道的细菌,是一个新种。本文介绍了菌株 F10 的生物学特征和分类鉴定结果。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养条件

嗜碱菌株 F10 分离自内蒙古海拉尔地区的好纪

湖^[2]。分离和培养采用完全培养基^[3]。筛选培养基:每升含 1.0g KH_2PO_4 , 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02g CaCl_2 , 4.0g NH_4NO_3 , 0.25g MnSO_4 , 1.0g Lignin, 10.0g Na_2CO_3 , 50.0g NaCl, pH 10。对照菌株为热带双芽孢杆菌(*Amphibacillus tropicus*) Z-7792。

1.2 生理生化试验、细胞壁分析和菌体脂肪酸成分分析

生理生化试验参见文献[4]。细胞壁氨基酸成分分析参见文献[5]。全细胞脂肪酸分析采用标准方法并利用美国 MIDI 公司 Sherlock 全自动细菌鉴定系统分析成分。

1.3 基因组 DNA 的 (G + C)mol% 含量测定

DNA 提取参照 Marmur^[6]的方法。采用熔点法(T_m 值法)测定 (G + C)mol% 含量^[7],对照菌株为大肠杆菌(*Escherichia coli*) AS 1.365。

1.4 DNA-DNA 同源性实验

采用荧光标记法^[8]。高纯度 DNA,超声波剪切 10s,将 DNA 断裂成 300~700bp,将 DNA 共价结合到 96 孔板中,经洗脱后准备进行杂交。另将没有超声波破碎的 DNA 用光敏生物素标记,标记反应结束后再用超声波剪切 10s,制成探针。然后进行杂交,温度为 60℃。3h 后取出清洗,在读板器下读取结果。

1.5 16S rRNA 基因的序列分析

16S rRNA 基因的 PCR 扩增和序列测定参见文献[2]。将菌株 F10 的 16S rDNA 的序列与从 GenBank/EMBL/DDBJ 等数据库中获得的 16S rDNA 序

基金项目: 国家“863 计划”(2001AA626040)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62627951; Fax: 86-10-62651577; E-mail: mayanhe@sun.im.ac.cn

作者简介: 赵大鹏(1978-)男,硕士研究生,主要从事嗜碱细菌筛选和分类方面的研究。E-mail: dpengzhao@sina.com

收稿日期: 2004-04-29,修回日期: 2004-07-12

列,采用 ClustalW1.8 软件进行多序列匹配排列,通过 TreeconW1.3b 程序中 Neighbor-Joining 方法,采用 Kimura 双参数计算模型构建系统发育树。

菌株 F10 的 16S rDNA 序列已存放在 GenBank 核苷酸序列数据库中,存取号是 AF275698。

2 结果

2.1 生长条件

菌株 F10 为嗜盐碱菌,其生长 pH 范围为 pH7.0 ~ 10.5,最适生长 pH 为 9.5,生长温度范围为 10 ~ 45℃,最适生长温度为 37℃,生长 NaCl 浓度范围 0% ~ 15%,最适生长的 NaCl 浓度为 3%。

2.2 形态和培养特征

菌株 F10 革兰氏染色阳性,杆状或短杆状,大小为 0.6μm ~ 0.8μm × 1.0μm ~ 3.0μm,以周生鞭毛运动(图 1),可形成芽孢,菌落呈圆形,表面光滑,边缘整齐,低凸起,有光泽,肉粉色,不透明。

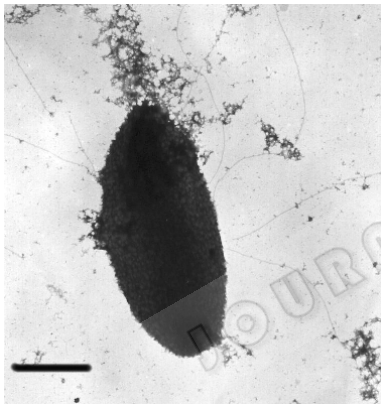


图 1 菌株 F10 的透射电镜照片
Fig.1 Transmission electron microphotograph of strain F10(Bar ,0.5μm)

2.3 生理生化特性

菌株 F10 兼性厌氧生长;可水解淀粉,不能水解酪素、明胶和吐温,过氧化氢酶、氧化酶、脲酶、甲基红反应为阴性;吲哚、硫化氢、硝酸盐还原均为阳性,能利用葡萄糖、蔗糖、半乳糖、果糖和麦芽糖产酸。

2.4 化学分类特征

菌株 F10 的脂肪酸主要为 C16:0 和 C18:1w7c,含量分别为 32.0% 和 41.2%。其细胞壁的氨基酸为 Meso-diaminopimelic acid(meso-DAP)。

2.5 DNA 的 (G + C)mol% 含量和 DNA-DNA 杂交

菌株 F10 总 DNA 中 (G + C)mol% 的含量为 42.2 mol%。菌株 F10 与 *A. tropicus* Z-7792 DNA-DNA 杂交率为 31%。

2.6 以 16S rDNA 序列同源性为基础的系统发育学分析

测序的结果得到了 1455bp 的 16S rDNA 序列,从 GenBank、EMBL 和 DDBJ 数据库中得到与菌株 F10 相近的 16S rDNA 序列做系统发育树图(图 2)。从图中可以看到,菌株 F10 归属于 *Amphibacillus* 类群中,和 F10 亲缘关系最近的是 *Amphibacillus tropicus*,二者的 16S rDNA 序列的相似性为 96%。F10 和 *Amphibacillus* 的其它种 16S rDNA 的序列相似性低于 94%。

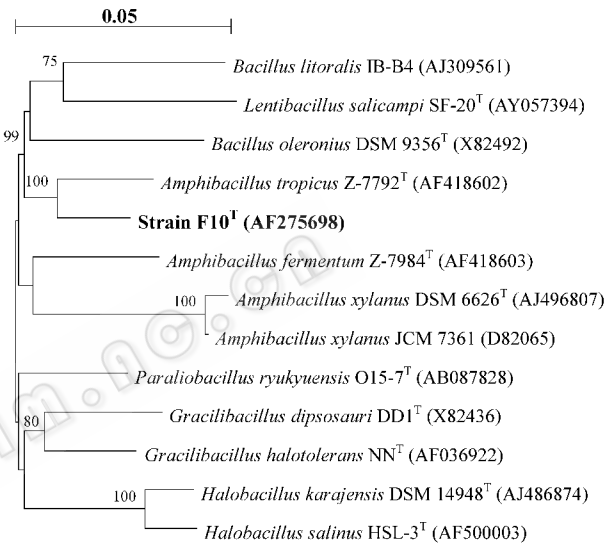


图 2 F10 和相关细菌的系统发育树
Fig.2 Phylogenetic tree of strain F10 and related bacteria based on 16S rDNA sequences
The scale bar indicates 0.05 substitutions per nucleotide position. Bootstrap values (expressed as percentages of 100 replications) greater than 70% are shown at the branch points. In the brackets after each bacterial name are 16S rDNA accession numbers in GenBank Databases.

3 讨论

基于 16S rDNA 的系统发育分析和其它特性, Niimura 等^[9]于 1990 年建立新属双芽孢杆菌属(*Amphibacillus*),到现在为止^[12], *Amphibacillus* 属中只有 3 个明确的种:木素双芽孢杆菌(*Amphibacillus xylanus*)、发酵双芽孢杆菌(*Amphibacillus fermentum*)和热带双芽孢杆菌(*Amphibacillus tropicus*)。系统发育分析表明,菌株 F10 与 *Amphibacillus* 属的亲缘关系最近。而且,菌株 F10 具有与 *Amphibacillus* 属相同的一系列表型特征,例如革兰氏染色阳性、杆状、有芽孢、兼性厌氧、轻微嗜盐嗜碱、能利用碳水化合物产酸、细胞壁氨基酸为 meso-DAP、基因组 DNA 的 (G + C) mol% 是 42.2%,DNA 的 (G + C) mol% 相差

不到 5% 等。这些基因型和表型特征表明这个新的分离菌是 *Amphibacillus* 属中的一个成员。

但是,根据一些表型和基因型特性,菌株 F10 与已确定的种之间有明显的差异(表 1)。菌株 F10 以周生鞭毛运动,从形态学特征可与 *Amphibacillus xylanus* 和 *Amphibacillus fermentum* 区分开来。在生长特征方面,F10 最适生长 NaCl 浓度 3%,而 *Amphibacillus* 其它菌株最适生长 NaCl 浓度大于 5%;F10 可以还原硝酸盐,而 *Amphibacillus* 其它菌株不能还原硝酸盐;F10 不产生 catalase,可与 *Amphibacillus tropicus* 和 *Amphibacillus fermentum* 区分开来。从系统发育树图分析,菌株 F10 的 16S rDNA 序列与 *Amphibacillus* 属的菌株 *Amphibacillus tropicus* 关系最近,但两者的

进化距离仍较大,为 0.4。一般认为,16S rDNA 序列同源性小于 97%,可以认为属于不同种^[10],菌株 F10 与其它成员同源性数值小于 94%,因此,从系统发育角度分析,菌株 F10 应当是不同于 *Amphibacillus* 属中各成员的一个新种。DNA-DNA 杂交是确定不同种的基本方法,一般认为同源性小于 70% 可以划分为不同的种^[11],菌株 F10 与关系最近的 *Amphibacillus tropicus* 杂交同源性为 31%,这说明它们应当属于不同的种。综上所述,从形态、生理生化、化学特征、系统发育学分析和 DNA-DNA 杂交试验等多方面分析,菌株 F10 是 *Amphibacillus* 属中一个与其它成员不同的新种,命名为好纪双芽孢杆菌 *Amphibacillus haojiensis* sp. nov.。

表 1 菌株 F10 和双芽孢杆菌属其它菌种表型特征的比较

Table 1 Comparison of phenotypic features of strain F10 and the species of <i>Amphibacillus</i>				
Character	Strain F10	<i>A. tropicus</i>	<i>A. xylanus</i>	<i>A. fermentum</i>
Flagella	Multiple	Multiple	-	Single
Colony pigmentation	Pinkish white	Pinkish white	White	Yellowish
pH range	7 ~ 10.5	8.5 ~ 11.5	8 ~ 10	7 ~ 10.5
Optimal NaCl/%	3	5 ~ 10	ND	10
Temperature range/℃	10 ~ 45	18 ~ 56	25 ~ 45	18 ~ 56
Nitrate reduction	+	-	-	-
Catalase	-	+	-	+
Hydrolysis of casein	-	-	-	-
Hydrolysis of starch	+	+	+	+
Hydrolysis of Tween80	-	+	ND	+
(G + C) mol%	42.2	39.2	36	41.5
Acid production from				
D-fructose	+	+	+	+
D-galactose	+	-	ND	+
D-glucose	+	+	+	+
Lactose	-	+	ND	+
Maltose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+

+ :Positive ; - :Negative ; ND :No data.

新种好纪双芽孢杆菌(*Amphibacillus haojiensis* sp. nov.)的特征如下:革兰氏染色阳性,杆状或短杆状,大小为 0.6μm ~ 0.8μm × 1.0μm ~ 3.0μm,以周生鞭毛运动,可形成芽孢,兼性厌氧生长;菌落呈圆形,表面光滑,边缘整齐,低凸起,有光泽,肉粉色,不透明。其生长 pH 范围为 pH7.0 ~ 10.5,最适生长 pH 为 9.5,生长温度范围为 10 ~ 45℃,最适生长温度为 37℃,生长 NaCl 浓度范围 0% ~ 15%,最适生长的 NaCl 浓度为 3%。可水解淀粉,不能水解酪素、明胶和吐温,过氧化氢酶、氧化酶、尿酶、甲基红反应为阴性;吲哚、硫化氢、NO₃-还原为阳性;能利用葡萄糖、蔗糖、半乳糖、果糖和麦芽糖产酸。脂肪酸主要成分为 C16:0 和 C18:1 w7c,细胞壁氨基酸为

meso-DAP。DNA 中(G + C) mol% 含量为 42.2mol%。分离自内蒙古海拉尔地区的好纪湖。模式菌株为菌株 F10。

参 考 文 献

[1] 管筱武,张甲耀,罗宇焯,等.嗜碱木素降解菌降解能力的初步研究.中国造纸,1999,18(6):19-22.
[2] 张伟周,毛文扬,马延和,等.内蒙古海拉尔地区碱湖嗜碱细菌的多样性.生物多样性,2001,9:44-50.
[3] Horikoshi K. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* No. 221. *Agric Biol Chem*, 1971, 36:1407-1414.
[4] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册.北京:科学出版社,2001.

[5] Schleifer K H. Analysis of the chemical composition and primary structure of murein. *Methods Microbiol* , 1985 , **18** : 123 – 156.

[6] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J Mol Biol* , 1961 **3** 208 – 218.

[7] Marmur J ,Doty P. Determination of the base composition of deoxyri-bonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Bi-ol* , 1962 , **5** :109 – 118.

[8] Ezaki T , Hashimoto Y ,Yabuuchi E. Fluorometric DNA-DNA hy-bridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic re-latedness among bacteria strains. *Int J Syst Bacterial* , 1989 , **39** : 224 – 229.

[9] Niimura Y , Koh E , Yanagida F ,et al. *Amphibacillus xylanus* gen. nov. , sp. nov. , a facultatively anaerobic sporeforming xylan-digest-ing bacterium which lacks cytochrome , quinone , and catalase. *Int J Syst Bacteriol* , 1990 , **40** 297 – 301.

[10] Oren A , Ventosa A ,Grant W D. Proposed minimal standards for the description of new taxa in the Order *Halobacteriales* . *Int J Syst Bac-teriol* , 1997 , **47** 233 – 238.

[11] Devereux R , He S , Doyle C L ,et al. Diversity and origin of Desul-fovibrio species : phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol* , 1990 , **172** 3609 – 3619.

[12] Zhilina T N ,Gamova E S. *Amphibacillus fermentum* sp. nov. and *Amphibacillus tropicus* sp. nov. , new alkaliphilic , facultatively anaerobic , saccharolytic bacillus from Lake Magadii. *Mikrobiologiya* (English translation) 2001 , **70** 711 – 722.

***Amphibacillus haojiensis* sp. nov.——A novel Alkaliphilic and Slight Halophilic Bacterium from Haoji Soda Lake in Inner Mongolia Autonomous Region , China**

ZHAO Da-Peng ZHANG Wei-Zhou XUE Yan-Fen MA Yan-He*
(*Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China*)

Abstract : An alkaliphilic and slightly halophilic Gram-positive rod , designated strain F10 , was isolated from Haoji soda lake in Inner Mongolia Autonomous Region , China. Strain F10 grew optimally in the presence of 3 % (W/V) NaCl , pH 9.5 and 37℃. It was facultatively anaerobic , motile with peritrichous flagella , sporulating , catalase- negative. The (G + C) content of the DNA was 40 mol % . The cell wall contained meso-DAP. Phylogenetic analyses based on 16S rDNA sequences comparisons indicate that strain F10 was a member of the genus *Amphibacillus* . DNA-DNA similarity of less than 30 % with the described species of *Amphibacillus* supported the view that this organism represented a new spe-cies of the genus *Amphibacillus* . The name *Amphibacillus haojiensis* sp. nov. is proposed.

Key words : Alkaliphile , Polyphasic taxonomy , *Amphibacillus haojiensis* sp. nov.

Foundation item : Chinese National Research Program (2001AA626040)
* Corresponding author. Tel 86-10-6262795 ; Fax : 86-10-62651577 ; E-mail : mayanhe@sun.im.ac.cn
Received date : 04-29-2004

本 刊 重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要 扩大作者学术交流渠道 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“ 中国期刊网 ”。如作者不
同意将文章编入该数据库 请在投稿时声明 否则本刊将视为同意收录。
另外 从 2002 年开始 凡被本刊录用的文章均统一纳入“ 万方数据——数字化期刊群 ”,进入因特网提供信息服务。有不
同意者 请事先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬 不再另付。
读者可上网查询浏览本刊内容 并征订本刊。刊物网址 :http://wsxb.periodicals.com.cn