

一株具霉菌抑制活性细菌的鉴定

曹冬梅,何成华,景 晟,张洪英,张海彬*

(南京农业大学动物医学院 南京 210095)

摘 要:为探讨菌株 HB02 对霉菌生长的影响,将 HB02 与霉菌孢子悬液同时加入到 PYG 肉汤,在 28℃ 培养 15d。在培养的第 3、6、9、12 和 15 天测定培养液中的黄曲霉和禾谷镰刀菌菌丝重量。结果显示:与对照组相比,HB02 可显著抑制黄曲霉和禾谷镰刀菌生长($P < 0.01$)。通过常规细菌学实验鉴定该菌株为一株乳酸杆菌。通过分子生物学方法测定了菌株的 16S rRNA 基因序列,进一步证实了 HB02 为一株乳酸杆菌。根据 Berthier 等的方法,通过 HB02 16S/23S rRNA 基因间隔(Intergenic Spacer Regions, ISR)序列的扩增和测定,再通过基因文库中所有细菌基因序列比较分析,最终鉴定菌株 HB02 为一株弯曲乳酸杆菌(*Lactobacillus curvatus*)。

关键词:霉菌;16S/23S rRNA;基因间隔序列;弯曲乳酸杆菌

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2006)03-0467-03

黄曲霉毒素(afatoxin)是黄曲霉(*Aspergillus flavus*)与寄生曲霉(*A. parasiticus*)的二次代谢产物,黄曲霉毒素被认为有致癌性、诱变性和致畸性,大量试验证明黄曲霉毒素 B₁ 可致许多动物发生肝癌。镰刀菌属各产毒菌株均能在农作物及农产品中产生单端孢霉毒素,该毒素对动物的毒害作用较为广泛,包括胃肠道功能障碍(如呕吐、腹泻)、贫血、白细胞减少症、皮炎、食欲减退、流产等。另外单端孢霉毒素是强有力的免疫抑制剂,能影响动物免疫细胞功能,降低机体免疫力^[1-3]。

随着霉菌抑制剂及霉菌生物去毒剂的不断深入研究,具有霉菌抑制活性细菌的研究亦广泛开展^[4-6]。本实验室已分离并保存一株具霉菌抑制活性的细菌。本文就该菌对目前认为在饲料工业以及农业生产中污染最严重和分布最广泛的两种真菌——黄曲霉和禾谷镰刀菌的生长抑制作用进行了比较,并通过常规生物学特性以及分子水平的基因序列特性分析,将该菌鉴定为弯曲乳酸杆菌。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:HB02 为本实验室保存菌株,产毒黄曲霉蟑螂 70-1 毒株由南京疾病预防控制中心惠赠,禾谷镰刀菌 YJ04 由本实验室分离鉴定。

1.1.2 培养基:改良 MRS 培养基(pH 6.8,培养基成分中加入 2% CaCO₃)、PYG 培养基等。

1.1.3 主要试剂和仪器:限制性内切酶 *EcoR* I, *Hind* III, T-vector 连接酶等购自上海生物工程有限公司;DNA 回收试剂盒购自 TaKaRa 公司;余试剂为进口或国产分析纯。J-6M 高速冷冻离心机购自美国 BECKMAN 公司;PCR 仪购自美国 PE 公司;凝胶自动成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;MC5 型天平购自德国赛多利斯集团。

1.2 霉菌孢子悬液的制备

产毒黄曲霉蟑螂 70-1 毒株和禾谷镰刀菌 YJ04 接种在沙堡斜面,28℃ 培养 10d 后,加入一定量的灭菌磷酸盐缓冲液(含体积分数 0.05% 的吐温-80),用接种针挑取斜面上的孢子,然后将含有霉菌孢子的磷酸盐缓冲液通过纱布过滤以除去菌丝残体。将孢子浓度调整为 1×10^7 CFU/mL,4℃ 待用。

菌株 HB02 培养液的制备:将 HB02 接种到 PYG 肉汤中(pH6.8),37℃ 厌氧培养 24h 后活菌计数,将细胞浓度调整为 1×10^8 CFU/mL 待用。

1.3 HB02 对黄曲霉及禾谷镰刀菌生长的抑制作用

本试验分 3 组:第一组,将 HB02 培养液(1×10^8 CFU/mL) 1mL 接种到 100mL PYG 肉汤中,同时接种 1mL 黄曲霉孢子悬液(1×10^7 CFU/mL);第二组,将 HB02 培养液(1×10^8 CFU/mL) 1mL 接种到 100 mL PYG 肉汤中,同时接种 1mL 禾谷镰刀菌孢子悬液(1×10^7 CFU/mL);第三组是 PYG 对照组,将 1mL 黄曲霉孢子悬液、1mL 禾谷镰刀菌孢子悬液(1×10^7 CFU/mL) 分别接种到 100mL PYG 肉汤中。

经过上述处理的 3 个试验组在 28℃ 静置培养 15d,在培养的第 3、6、9、12 和 15d 测定培养液中黄曲霉菌丝和禾谷镰刀菌菌丝的重量。

1.4 菌丝重量的测定

首先用 Whatman NO.4 滤纸过滤培养液,将菌丝放入预先称重的平皿中,90℃ 烘烤 24h,然后将菌丝放入干燥器中至恒重,将此作为 100mL 培养液的菌丝重量。用 MC5 型天平称菌丝重量,天平感量是 0.001mg。

1.5 细菌培养及生物学特性鉴定

根据 Bergey's 系统细菌学方法鉴定^[7]。

1.6 HB02 菌株种属的分子生物学鉴定

1.6.1 细菌基因组 DNA 的分离:参照文献^[8]进行。

1.6.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增:根据乳酸杆菌 16S rRNA

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30471277)教育部博士点基金项目(20040307043)

* 通讯作者。Tel:86-25-84396478 Fax:86-25-84396434 E-mail:haibinzh@njau.edu.cn

作者简介:曹冬梅(1979-),女,江苏扬中人,兽医微生物学与免疫学硕士。

收稿日期:2005-08-10 接受日期:2005-09-05 修回日期:2005-12-09

相关序列经计算机软件(Primer Designer 第3版)自动设计引物。上游引物 P1: 5'-TGGGATACCACTTGGAAACA-3' (129-149); 下游引物 P2: 5'-TGGAGTCCGAAGTGGAAACA-3' (1285-1305); 引物由上海博亚生物工程有限公司合成; 扩增 16S rRNA 目的片段预计为 1176 bp。PCR 扩增条件: 95°C 5 min; 94°C 1 min, 54.4°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。

1.6.3 16S-23S rRNA 基因的 PCR 扩增 根据 Berthier 等^[9]的方法, 合成一对引物, 序列如下: 上游引物 P1 5'-GCTGGATCA CCTCTTTC-3'; 下游引物 P2 5'-AGTGCCAAGGCATCCACC-3', P1 位于乳酸杆菌 16S rRNA 基因片段 3' 端, P2 位于乳酸杆菌 23S rRNA 基因片段 5' 端, 引物由上海博亚生物工程有限公司合成。PCR 扩增体系和扩增条件与 1.6.2 相同。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。

1.6.4 分子克隆及测序 首先, 参照 TaKaRa 公司 DNA 胶回收试剂盒说明书回收 PCR 扩增产物, 然后, 将 PCR 产物与 pMD 18-T Vector 进行连接。感受态大肠杆菌 DH5 α 的制备、转染和筛选主要按文献 [8] 中的方法。

1.7 统计方法

本试验重复 3 次, 以菌丝重量的平均值进行数据统计, 采用 SPSS 中 LSD 方差分析。

2 结果

2.1 HB02 对黄曲霉及禾谷镰刀菌生长的抑制作用

由表 1 可见, 与对照组相比, 菌株 HB02 分别与黄曲霉孢子、禾谷镰刀菌孢子同时接种到 PYG 肉汤中, 菌丝重量均减少了, 统计学分析表明差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 1 HB02 对黄曲霉及禾谷镰刀菌生长的抑制作用

Table 1 Inhibition to growth of *Aspergillus flavus* and *Gibberellae* in the present of strain HB02

Strains	t/d	Weight of mycelium (mg/mL)	
		<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Gibberellae</i>
HB02	3	ND	ND
	6	ND	ND
	9	ND	0.021 \pm 0.010
	12	0.0233 \pm 0.005	0.038 \pm 0.004
	15	0.0285 \pm 0.004	0.0563 \pm 0.012
Control group	3	1.638 \pm 0.43	0.2310 \pm 0.054
	6	0.9400 \pm 0.21	0.8210 \pm 0.210
	9	1.1513 \pm 0.30	0.8956 \pm 0.262
	12	0.8614 \pm 0.18	1.4410 \pm 0.150
	15	1.1633 \pm 0.26	1.5613 \pm 0.52

ND: not detected.

2.2 HB02 菌株的生物学特性及鉴定

HB02 菌株经常规培养和生物学特性观察, 发现其主要生物学特性如下: 革兰氏染色阳性, 菌体杆状, 单个, 成对或短链, 无芽胞、无鞭毛, 不运动, 小菌落, 圆形, 直径 1.0mm 左右, 边沿整齐光滑, 呈淡乳白色, 液体培养混浊生长, 兼性厌氧, 生长最适温度 37 ~ 42°C, 最适 pH 6.2 ~ 6.8, 接触酶阳性, 不液化明胶, 不还原硝酸盐, 不产生吲哚、硫化氢, 不分解尿素, MR 反应阳性, VP 反应阳性, 利用柠檬酸盐、葡萄糖、核糖和乳糖发酵产酸。

根据文献 [7], 上述各项试验结果符合乳酸杆菌属特征。

故 HB02 菌株可初步定为乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.)。

2.3 HB02 16S rRNA 基因序列的扩增

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 在大于 1000bp 处有一亮带, 大小约为 1176 bp, 与预期一致。

2.4 HB02 16S rRNA 基因序列测定

PCR 产物克隆到 T-vector 中, 得到 T-16S rRNA 重组体, 转化入 *E. coli* DH5 α 后, 将鉴定为阳性的重组体送大连 TaKaRa 公司进行测序, 得到大小为 1176bp 的序列, 与预期结果一致。HB02 16S rRNA 基因序列 GenBank 号 (AF090328) 与已知核酸序列进行比较分析, 结果与乳酸杆菌的同源性为 100%, 从分子水平上进一步确定了 HB02 为一株乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.)。

2.5 HB02 菌株 16S/23S rRNA ISR 序列的扩增结果

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, HB02 菌株显示 ISR 序列含两条目的亮带, 大小在 250 ~ 500bp 之间。

2.6 菌株 HB02 16S/23S rRNA ISR 序列的测定以及与 GenBank 序列比对结果

ISR 序列有两条, 根据 Berthier 等^[9]的报道, 小片段 (250bp 左右) 的 ISR 在密切相关的乳酸杆菌种属间的同源性一般为 100%, 不具比较意义, 因而本实验对大小为 500bp 左右的 ISR 序列进行了测序。PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体中, 得到 T-16S-23S rRNA 重组体, 转化入 *E. coli* DH5 α 后, 将重组体送大连 TaKaRa 公司进行测序, 大小为 426bp (GenBank 号为 AF090328)。经过比对, HB02 ISR 序列与已知弯曲乳杆菌 (*L. curvatus* *rrn operon*, Z75469.1) 16S-23S ISR (long) 的序列同源性达到 99.1% (422/426)。可以确定 HB02 为一株弯曲乳杆菌。

与已知弯曲乳杆菌 (Z75469.1) 的 16S/23S rRNA ISR 序列进行比对发现, HB02 的序列发生了 75 位 T-C 替换, 114 位 A-G 替换, 299 位 C-G 替换, 并在 197 位多出 1 个 C。

3 讨论

在研究菌株 HB02 与黄曲霉和禾谷镰刀菌的相互作用时发现, 与对照组相比, 当 HB02 与霉菌同时接种到 PYG 液体培养基时, HB02 可显著抑制黄曲霉和禾谷镰刀菌的生长。经过培养特性观察及生理生化实验分析初步鉴定为一株乳酸杆菌, 并通过分子生物学方法测得其 16S rRNA 部分序列, 经比对分析进一步得到了证实。16S rRNA 全序列分析在分类中对于确定细菌种属具有重要的参考价值。

应用分子生物学的方法, 能够根据益生菌基因组 DNA 序列的特异性, 进行群间、属间、种间、亚种间、乃至菌株之间的鉴定, 帮助从复杂的培养物中间分离菌株。对于乳杆菌属的鉴定, 传统的生理生化实验因为其结果的许多相似性而存在一些限制^[7,10]。因此, 许多研究致力于应用分子生物学方法快速鉴定乳杆菌^[11]。目前, 有许多方法如基因组探针技术和基因组指纹技术 (如 RFLPs 技术、RAPD 技术和 AFLPs 技术), DNA-DNA 杂交技术、DNA 测序、脂肪酸分析等已经建立并应用到鉴定益生菌中^[12]。探针技术与生物芯片技术结合, 能够从复杂微生物环境中快速检出并追踪感兴趣的菌株, 探针技术使用的探针包括核糖体寡核苷酸探针 (一般是 16S rRNA) 全染色体探针、根据基因组的特殊的序列设计的 DNA 片段、质粒 DNA 探针等。基因组指纹技术利用 DNA 片

段长度的多态性,能够区分不同的菌株,帮助分析动态的、多样的微生物菌群。近来,rRNA基因作为细菌的鉴定和种属发生分析的潜在靶序列已经被普遍接受了^[13]。利用针对16S rDNA或23S rDNA的引物已经检测鉴定了相应乳杆菌种^[14,15]。而且已有报道应用复合PCR技术可同时检测并鉴定多株细菌^[16]。这种复合PCR所用引物是分别根据种属特异的16S rRNA基因序列或含16S rRNA 3'端或23S rRNA 5'端的16S-23S rRNA基因间隔区(ISR)序列设计的。Berthier等^[9]亦用针对16S/23S rRNA基因间隔区(ISR)的引物成功建立了快速鉴定两组密切相关乳杆菌的方法。本实验根据Berthier等的报道合成了一对16S/23S rRNA SR序列引物,对乳杆菌HB02的ISR序列进行了扩增,从扩增结果可以看出乳杆菌的ISR目的片段为两条,与报道一致,大小接近,由于Berthier等的实验结果表明小片段的ISR序列在乳酸杆菌密切相关的种属间的同源性一般为100%,不具比较意义,因而对大片段的ISR序列进行了测序。通过对照比对,与弯曲乳酸杆菌rm operon,16S-23S ISR(long)的同源性达到99.1%(422/426),可以确定HB02为一株弯曲乳酸杆菌。

另外PCR技术和其它技术联用为益生菌的研究提供了有力的技术手段,PCR技术相对简单快速,不需要进行繁杂的微生物培养,利用专一性的引物,分析复杂菌群的菌种分布情况,检测染色体上是否存在致病因子的基因,帮助进行菌株鉴定。总之,本研究从分子水平对HB02菌株的分类学地位的鉴定为今后对该菌的深入研究打下基础。

参 考 文 献

[1] 张海彬,陆承平.用改良高效液相色谱法测定饲料中酪青霉毒素.南京农业大学学报,2002,25(4):87-89.
 [2] 张海彬,陆承平.饲料中娄地青霉(*P. roqueforti*)的检测.畜牧与兽医,2003,35(1):5-7.
 [3] 李建科,张海彬.畜产食品中有害物质残留分析及安全性评价.畜牧与兽医,2003,35(2):37-40.
 [4] 蒋继志,赵丽坤,史娟,等.几种真菌发酵液对致病疫霉的抑制作用.微生物通报,2001,28(2):55-59.

[5] 龙建友,姬志勤,师宝君,等.一株抗生素产生菌No.24菌株发酵液抗菌谱及稳定性测定研究.西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(S1):65-68.
 [6] 张海彬,陆承平.微生物去毒剂去除饲料中真菌毒素的猪体试验.中国农业科学,2002,35(10):115-118.
 [7] Holt JG, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1994, 1209-1234.
 [8] 梁国栋.最新分子生物学实验技术.北京:科学技术出版社,2001.
 [9] Berthier F, Ehrlich SD. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol Lett*, 1998, 161(1):97-106.
 [10] Berthier F, Ehrlich SD. Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, 49(3):997-1007.
 [11] Andrighetto C, deDea P, Lombardi A, et al. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Res Microbiol*, 1998, 149(9):631-643.
 [12] Yeung PS, Sanders ME, Kitts DL, et al. Species-specific identification of commercial probiotic strains. *J Dairy Sci*, 2002, 85(5):1039-1051.
 [13] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1):143-169.
 [14] Nour M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. *Res Microbiol*, 1998, 149(6):433-448.
 [15] Ward LJ, Timmins MJ. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol*, 1999, 29(2):90-92.
 [16] Schleifer KH, Ehrmann M, Beimfohr C, et al. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int Dairy J*, 1995, 5(8):1081-1094.

Identification of a bacterium with activities of inhibiting growth of fungi

CAO Dong-mei, HE Cheng-hua, JING Sheng, ZHANG Hong-ying, ZHANG Hai-bin*

(College of Animal Medicine, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China)

Abstract: HB02 is characterized as a new microbiological agent that has the potential to decrease the toxicity of mildewed wheat containing Deoxynivalenol (DON). To explore whether HB02 could inhibit the growth of fungi, a spore suspension of *Aspergillus flavus* or *Gibberellazeae* was incubated with or without HB02 in PYG medium at 28°C for 15d. The mycelium was weighed after 3, 6, 9, 12, 15 d of incubation, respectively. The result showed that the growth of these two important fungi was significantly inhibited by co-cultivation with HB02. Besides, HB02 was confirmed as *Lactobacillus curvatus* by its microbiological characters and the 16s-23s rRNA sequence. In conclusion, HB02, identified as *Lactobacillus curvatus*, prevent the effects of mycotoxins in contaminated feed by inhibiting the growth of fungi. Other detoxification ways of HB02 remain further study.

Keywords: Fungi; 16S-23S rRNA; Intergenic spacer region (ISR); *Lactobacillus curvatus*

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30471277)

* Corresponding author. Tel 86-25-84396478; Fax 86-25-84396434; E-mail: haibinzh@njau.edu.cn

Received: 10 August 2005/Accepted: 5 September 2005/Revised: 9 December 2005