

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(11):1421-1426; 4 November 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

一株分离自西藏高山草甸土壤的肠球菌的分离鉴定及代谢特征

杨磊^{1,2}, 邓宇², 张辉², 刁青云^{1*}

¹中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093

²农业部沼气科学研究所, 成都 610041

摘要:【目的】了解高海拔低温缺氧条件下土壤环境中微生物生理生化特性及代谢产物【方法】采用 Hungate 厌氧操作技术从西藏纳木措高山草甸土壤中分离到一株肠球菌 CJ-1。通过生理生化特征分析和 16S rRNA 基因序列的系统发育学分析确定该菌株的系统发育学地位。【结果】菌株 CJ-1 为兼性厌氧的革兰氏阳性菌, 菌体呈不规则球形, 大小为直径约 1 μm - 1.5 μm , 无鞭毛, 不运动, 成串珠型或成对排列。生长温度范围为 10 $^{\circ}\text{C}$ - 50 $^{\circ}\text{C}$ (最适温度为 25 $^{\circ}\text{C}$); pH 范围为 5.0 - 8.5 (最适 pH 为 7.0); NaCl 浓度为 0% - 7% (最适 NaCl 浓度为 5%)。能够利用葡萄糖、核糖、松三糖以及纤维二糖等多种碳水化合物, 发酵纤维二糖的产物是乳酸、乙酸、丙酸、 CO_2 、 H_2 以及少量的丁酸。菌株 CJ-1 的 (G + C) Mol% 为 39.2%。与 *Enterococcus aquimarinus* (CCM7283) 的相似性达 95.9%。菌株可利用纤维二糖, 其在沼气发酵过程中充当中间代谢物。【结论】菌株 CJ-1 为耐低温肠球菌, 可以降解纤维二糖等, 且适应性较强, 在发酵过程中具有重要意义, 将其暂定命名为 *Enterococcus namtsoensis*, 模式菌株 DSM23475^T (= ACCC 00521^T)。

关键词: *Enterococcus namtsoensis*, 生物降解, 鉴定

中图分类号: Q9339 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2012)11-1421-06

土壤是地球生态系统中很重要的一个环节, 由于不同土层矿物质、有机物质、空气和水分组成的不同, 因此土壤中微生物种群的构成也是千差万别^[1]。分子生态学研究表明, 土壤中存在大量的发酵型细菌, 研究土壤发酵细菌群落, 通过对其特殊代谢途径的菌株的研究并由此得出整个菌群的代谢方式^[2], 这将为大分子物质降解、环境治理以及发酵产生物质能源等各个方面提供启示^[3]。

肠球菌属的细菌广泛存在于水、土壤、植物以及人类、脊椎动物、爬行动物和昆虫的体内^[4]。在液体培养基中呈成对或短链, 不产芽胞, 革兰氏阳性, 有时以鞭毛运动, 没有明显的荚膜, 兼性厌氧, 化能

异养, 发酵代谢^[5]; 目前肠球菌属共有 39 个种, 可发酵的碳水化合物范围广泛。作者从高海拔那木措高山草甸泥土中分离到一株能够降解纤维二糖类物质的肠球菌 CJ-1。本文对其进行了初步研究, 它具有的纤维二糖发酵特性可以应用到沼气发酵和微生物降解污染物等各个方面。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 样品取自西藏那木措 (30 $^{\circ}$ 43'N 91 $^{\circ}$ 5'E.) 高山草甸泥土表层下 5 cm - 10 cm 处, 那

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA10Z420)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-62596412; E-mail: dqyun1@126.com

作者简介: 杨磊 (1984 -), 男, 北京人, 硕士研究生, 从事厌氧微生物研究。E-mail: ylliso1@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-06-07; 修回日期: 2012-08-28

木措海拔 4800 - 5000 米, 年平均气温为 4.3℃; 样品经采样器采集后立即放入密封袋中运至实验室 4℃ 恒温冰箱中进行保存^[6]。

1.1.2 主要试剂和仪器: BH-2 光学显微镜购于 OLYMPUS 公司, 721 型分光光度计购于上海第三分析仪器厂; 气相色谱 GC-2010 购于日本岛津 (Shimadzu) 公司; DU800 spectrophotometer 购于 Beckman 公司; 16S rRNA Bacterial Identification PCR Kit 和 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司, 纤维二糖购于上海阿拉丁公司。

1.2 菌株分离纯化

严格按照 Hungate 厌氧操作技术对菌株进行富集, 分离和鉴定。培养基 (g/l): KH_2PO_4 - 0.7 g; K_2HPO_4 - 0.7 g; NH_4Cl - 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.1 g; NaCl - 1.0 g; Na ascorbate - 1.0 g; 定量滤纸 - 2.0 g; pepton - 2.0 g; yeast extract - 1.0 g; Vitamin solution - 10 mL; trace elements - 10 mL; $\text{cys-HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ - 0.5 g^[7], 培养基分装于厌氧管或血清瓶中。(分离和鉴定培养碳源分别为纤维二糖、葡萄糖 - 2 g, 固体培养基另加琼脂 - 1.5 g) 取已灭菌培养基, 补加 NaHCO_3 溶液, 初次接种 10% 样品, 将 pH 调整为 7.0, 15℃ 静置培养。待滤纸条开始崩解时, 转接于新鲜培养基中继续富集, 连续转富集培养 2 次以上的培养物可以用于分离纯化。

1.3 形态观察

采用相差显微镜和扫描电子显微镜观察菌体形态, 电镜照片样品的制备参见文献【8】所述方法。

1.4 生理生化特性

采用葡萄糖 (0.2%) 作为碳源, 其中温度实验将菌株接种后放于 4℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃ 培养箱中进行培养, pH 试验接种后再用无菌无氧的 1 mol/L HCl 和 2 mol/L NaOH 溶液将培养基利用 pH 计精确调整至 5.0 - 9.0 之间, 7.0 - 8.5 采用 Tris-盐酸缓冲体系。最适生长条件下倍增时间测定实验取对数生长期菌体密度作非线性回归, 计算得到倍增时间^[9]。底物实验采用各种碳源代替葡萄糖 (终浓度为 2 g/L)。培养基灭菌后加入不同的抗生素 (终浓度 100 mg/L), 测定菌体密度以确定具体对不同抗生素的抗性。配制鉴定培养基 (终浓度为 1%): 分别添加不同刺激因子预先在不添加上述刺激因子的培

养基里连续传代三次作为接种物, 对照不添加上述刺激因子的培养物, 用以确定刺激因子对菌株的刺激性。

1.5 代谢产物测定

菌株 CJ-1 以葡萄糖为唯一碳源, 培养 (pH 7.0, 25℃) 72 h 后。对 CO_2 、乳酸、乙酸、丙酸、丁酸进行定量检测。

1.6 基因组 G + C 摩尔含量的测定

根据热变性温度法 (T_m 值法) 测定基因组 (G + C) mol%。测定菌株 DNA 的热变性温度 (T_m 值), 同时测定 *E. coli* K12 的 T_m 值。根据公式 (G + C) mol% = $51.2 + 2.08 \times [T_m(X) - T_m(K12)]$ 计算出 (G + C) mol%^[10]。

1.7 16S rDNA 序列扩增、测序及系统发育树构建

1.7.1 DNA 提取及 PCR 扩增: 菌株 CJ-1 以葡萄糖为底物培养至指数生长期, 离心收集菌体, 以天根生物公司细菌基因组试剂盒制备模板 DNA。

引物种类、PCR 反应体系、程序和测序方法均见文献 [8] 所述方法。测序结果由 ABI Prism Autoassembler software package 分析后, 序列提交 GenBank。

1.7.2 系统发育树构建: 提交菌株 CJ-1 的 16S rRNA 基因序列在 EMBL 数据库中进行比对, 选取与之相似性最高的肠球菌属中的 15 个模式种的 16S rRNA 基因序列, 进行 Clustalx 比对, MEGA3.1 分析, 采用 Neighbor-Joining 构建系统发育树, Bootstrap1000 次进行稳定性验证^[11]。

2 结果

2.1 形态特征

菌株 CJ-1 是兼性厌氧菌, 呈不规则的球形, 单个或连成串珠型但主要是成对生长 (图 1)。革兰氏阳性, 无鞭毛, 不运动。直径约 1 μm - 1.5 μm 。菌株在纤维二糖固体培养基培养 7 d 后形成白色、边缘模糊的菌落, 后期可产生黄色素。在液体培养基培养后期菌体会产生絮状沉淀, 并沉降在培养基底部。

2.2 生理生化特性

2.2.1 生理特性: 菌株 CJ-1 的生长温度范围是 10℃ - 50℃, 最适 25℃; 耐受 NaCl 浓度为 0% - 7%, 最适为 5%; 由 pH 实验得出, 菌株 CJ-1 生长

pH 范围为 5.0 - 8.5, 最适生长 pH 为 7.0; 倍增时间为 91.8 min (最适生长条件下)。

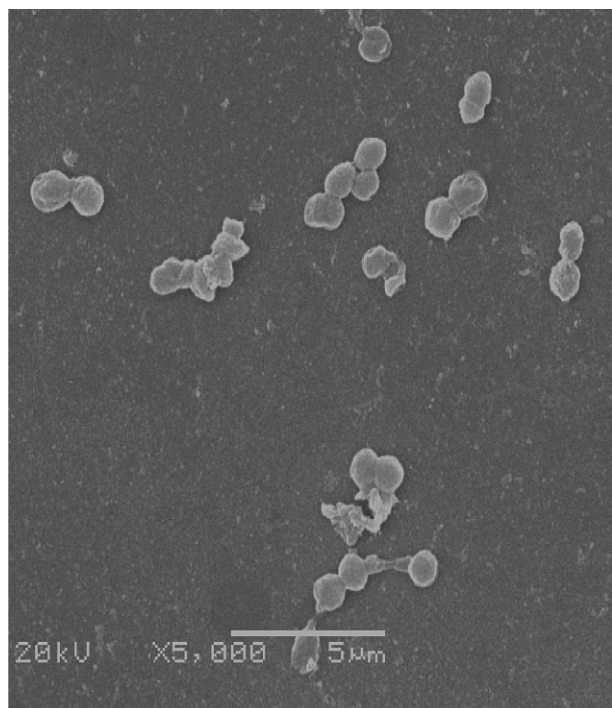


图 1 菌株 CJ-1 的扫描电镜照片

Fig.1 electron micrograph of CJ-1.

2.2.2 生化特性:底物实验结果表明, 菌株 CJ-1 可以利用葡萄糖、纤维二糖、核糖、木糖、木聚糖、棉子糖、麦芽糖、山梨糖、胰蛋白胨和菊糖等碳源。不能利用延胡索酸、甘露醇、D-山梨糖醇、鼠李糖、柠檬酸钠、苦杏仁苷。菌株 CJ-1 与其他肠球菌属模式菌株生理生化特性比较见表 1。

抗生素抗性实验结果表明, 菌株 CJ-1 对链霉素和红霉素具有抗性, 卡那霉素、氨基青霉素、氯霉素、利福平和四环素则对于菌株具有抑制作用。结果见图 2。

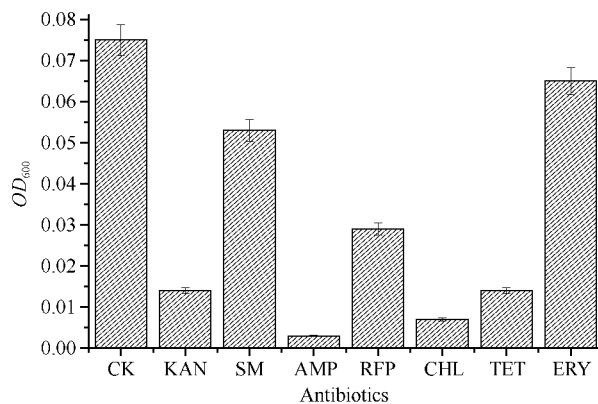


图 2 抗生素对菌株 CJ-1 的生长抑制

Fig.2 Effect of antibiotics on the grow of strain CJ-1.

表 1 CJ-1 与其他肠球菌的生理生化特征比较

Table1 Comparison of physiological characteristics of strain CJ-1^T and type species in genus *Enterococcus*

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Pigment production	+	-	+	-	-	-
β-Glucuronidase	+	-	-	-	-	-
Acidification of:						
L-Arabinose	+	+	-	-	-	-
Inulin	+	+	-	-	-	-
Melezitose	+	-	+	-	-	-
Melibiose	+	+	+	-	-	-
D-Raffinose	+	+	+	-	-	-
Ribose	+	-	+	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	-	-	-	+
Cellobiose	+	-	-	-	-	-
Temperature optimum	25°C	34°C	35°C	35°C	36°C	35°C
pH optimum	7.0	7.0 - 8.0	7.0 - 8.0	9.6	7.0 - 8.0	7.3 - 8.0
GC, mol%	39.2	38.7	38	39.9 - 41.1	38 - 39	37.8
NaCl optimum (v/v)	5%	5%	5%	5%	5%	5%
Source	soil	sea water	plant	food	dairy products	ferment leaves
References	This study	de Vaux et al., 1998 ^[5]	Collins et al., 1991 ^[11]	Fortina et al., 2004 ^[12]	Vancanneyt et al., 2004 ^[13]	Sukontasing et al., 2007 ^[14]

1, CJ-1; Data for *Enterococcus namtoensis* sp. nov. was obtained from this study; 2, *Enterococcus aquimarinus*; 3, *Enterococcus sulfureus*; 4, *Enterococcus italicus*; 5, *Enterococcus saccharominimus*; 6, *Enterococcus camelliae*, +, Positive; -, negative

生长因子实验结果表明：酵母粉能够明显促进 CJ-1 的生长, Casein peptone 和 Tryptone 具有微弱的刺激作用, 而 BBL 则对 CJ-1 的生长没有影响。

2.3 菌株 CJ-1 产物分析

菌株 CJ-1 代谢纤维二糖的产物分析：菌株 CJ-1 代谢纤维二糖的产物主要为乳酸、还有丙酸和少量的乙酸和丁酸。具体含量见表 2。

表 2 菌株 CJ-1 代谢产物

Table 2 The end products of strain CJ-1 from fermentation of D-glucose

H ₂ / (mol /L)	CO ₂ / (mol /L)	lactic acid (g /L)	acetate (g /L)	propionate / (g /L)	butyrate / (g /L)
0.0018	0.214	3.079	0.082	0.256	0.013

2.4 菌株 CJ-1 基因组 DNA (G + C) mol%

菌株 CJ-1 的基因组 DNA (G + C) mol% 为

39.2%，低于 *Enterococcus italicus* 和 *Enterococcus saccharominimus* 的 (G + C) mol%，略高于 *Enterococcus aquimarinus* 的 (G + C) mol%。

2.5 菌株 CJ-1 的 16S rRNA 序列的测定及系统发育树构建

菌株 CJ-1 的 16S rRNA 部分序列长 1447 bp, 在 GenBank 核酸登录号为 GU384204。

根据菌株 CJ-1 的测序结果 16S rDNA 序列进行 BLASTn 序列比对分析, 菌株 CJ-1 与 *Enterococcus aquimarinus* LMG 16607^T (AJ877015) 的相似性最高, 为 95.9%, 基于 16S rDNA 序列的相似性而构建的系统发育树见图 3。目前 CJ-1 的模式菌株的菌保号为 DSM23475^T (= ACCC 00521^T)。

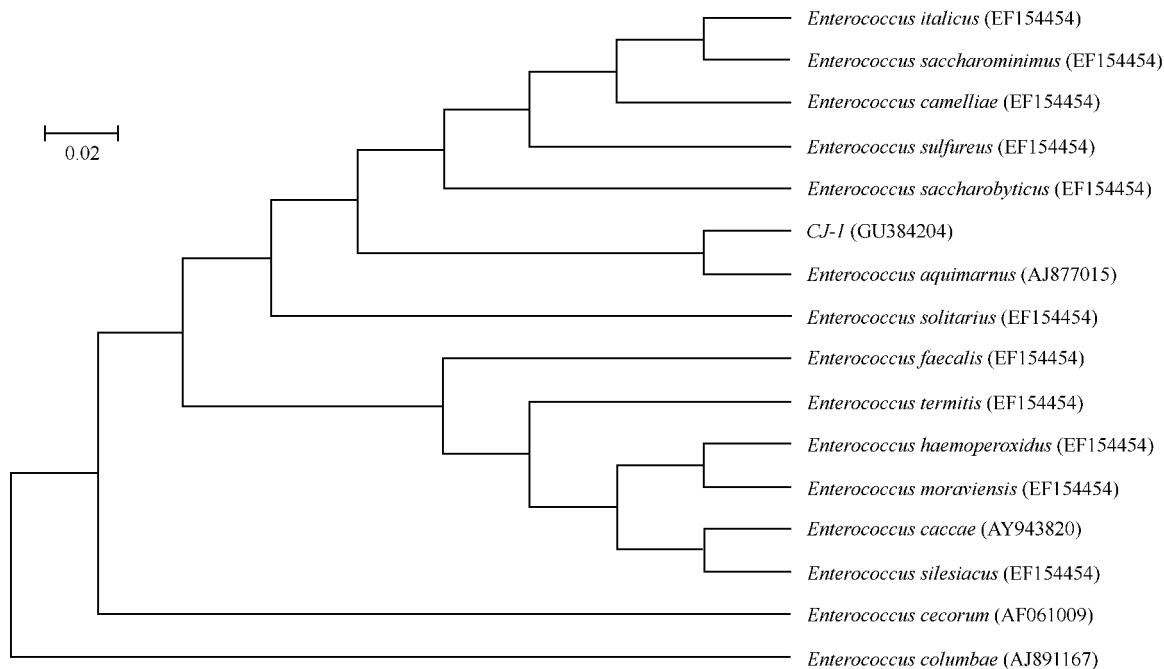


图 3 基于 16S rDNA 序列相似性构建的菌株 CJ-1 和其它肠球菌的系统发育树

Fig. 3 Position of the strain CJ-1 among closely related species of the genus *Enterococcus*, based on 16S rRNA phylogenetic analysis. Number in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Scale bar indicates the number of substitutions per nucleotide position.

3 讨论

沼气发酵是一个多菌群的相互作用的复杂过程, 有效的发酵过程控制需要对该过程进行更加深入的了解, 研究的核心问题是不同功能微生物、不同功能菌群之间的代谢机制和互营关系。各菌群之间

的关系则需要我们对单个菌株进行详细的了解。

(1) 系统发育分析显示菌株 CJ-1 与 *Enterococcus E. aquimarinus* 的 16S rDNA 序列相似性最高, 达 95.9%, 仅从相似性比较还无法区分菌株 CJ-1 在 *Enterococcus* 属的分类地位。生理生化实验分析来看, 菌株 CJ-1 的最适温度为 25℃, 这一最适温度与菌株 *E. aquimarinus* 的最适温度存在差别, 且

在对纤维二糖的利用以及其它生理特性也存在一些区别。到目前为止,还没有看到有关 *Enterococcus* 属 39 种模式菌株在沼气发酵中的报道,因此有关菌株 CJ-1 的分类地位还需 DNA 杂交等方法来进一步鉴定。

(2) 纤维素类大分子物质是我国废物循环利用产生物质能的重要原材料之一,但纤维素是高分子化合物,不溶于水及一般有机溶剂,难以被生物分解,纤维素生物转化的主要问题是无法深入其结构,因此纤维素类大分子物质的水解过程也是生物发酵过程的限速步骤之一^[15]。本菌株可以降解纤维二糖,这对纤维素类物质的合理利用产生了推动作用。而且该菌株代谢产物存在丙酸,丙酸在沼气发酵中转化到甲烷的速率很慢,经常积累导致体系失衡,如何解决沼气池的酸化问题也是促进我国沼气行业发展的一个重点^[13],研究该菌属的生理生化并找出和其它菌株的代谢关系对于沼气发酵的可控性将起到至关重要的作用。

(3) 那木措地区属于典型的寒带泥炭地貌,具有丰富的产甲烷菌群,是近年研究产甲烷菌的热点地区。本次在那木措高山草甸下发现的菌株 CJ-1 兼性厌氧,具有耐低温耐高盐的特性,且可以降解纤维二糖,分解产物许多是沼气发酵过程的重要中间代谢物。这说明 *Enterococcus* 属与产甲烷菌具有密不可分的关系。所以对于本株菌的研究无论是对于纤维素降解、沼气发酵功能菌群研究还是对于那木措地区微生物资源的分离鉴定都具有一定的意义。鉴于此,本文章将菌株 CJ-1 命名为 *E. namtsoensis*。

参考文献

- [1] 刘全全,刘海昌,邓宇,胡国全,张辉. 一株分离自高海拔土壤的梭菌的鉴定及代谢产物. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50:1135-1140.
- [2] 马诗淳,罗辉,尹小波,张辉,邓宇. 厌氧产氢微生物研究进展. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2009:1244-1252.
- [3] 成喜雨,刘春朝. 沼气发酵过程研究进展. 过程工程学报 (*Chinese Journal of Process Engineering*), 2008, 6(3): 607-616.
- [4] De Graef EM, Devriese LA, Vancanneyt, Baele M, Collins M, Lefebvre MD, Swings K, Haesebrouck JF. Description of *Enterococcus canis* sp. nov. from dogs and reclassification of *Enterococcus porcicus* Teixeira et al. 2001 as a junior synonym of *Enterococcus villorum* Vancanneyt et al. 2001. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(4): 1069-1074.
- [5] Pavel S, Vancanneyt M, Devriese LA, Naser SM, Snauwaert C, Lefebvre K, Hoste B, Swings J. *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(5): 2183-2187.
- [6] 仇天雷,承磊,罗辉,张辉,吴晓磊,邓宇. 一株近海沉积物中产甲烷菌的分离及鉴定. 中国沼气 (*China Biogas*), 2007, 25:3-6.
- [7] Zhilina TN, Appel R, Probian C, Brossa EL, Harder J, Widdel F, Zavarzin GA. *Alkaliflexus imshenetskii* gen. nov. sp. nov., a new alkaliphilic gliding carbohydrate-fermenting bacterium with propionate formation from a soda lake. *Arch Microbiol*, 2004, 182(2): 244-253.
- [8] 黎霞,承磊,汪卫东,邓宇,尹小波,张辉. 一株油藏嗜热厌氧杆菌的分离,鉴定及代谢产物特征. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48:995-1000.
- [9] 刘海昌,兰贵红,刘全全,曹毅,邓宇,张辉. 一株油藏嗜热厌氧杆菌的分离鉴定和代谢特征的分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50: 1525-1531.
- [10] Cheng L, Qiu TL, Yin XB, Wu XL, Hu GQ, Deng Y & Zhang H. *Methermicoccus shengliensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen isolated from oilproduction water, and proposal of *Methermicocaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(12): 2964-2969.
- [11] Murcia AJ, Collins MD. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. *FEMS Microbiol Lett*, 1991, 80(1): 69-73.
- [12] Fortina MG, Ricci G, Mora D, Manachini PL. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(5): 1717-1721.
- [13] Vancanneyt M, Zamfir M, Devriese LA, Lefebvre K, Engelbeen K, Vandemeulebroecke K, Amar M, De Vuyst L, Haesebrouck F and Swings J. *Enterococcus saccharominimus* sp. nov., from dairy products. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(6): 2175-2179.
- [14] Sukontasing S, Tanasupawat S, Moonmangmee S, Jung

SL and Suzuki K. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand, *International Journal of Systematic and Evolutionary*

Microbiology, 2007, 57 (9) :2151-2154.

[15] 周大石. 甲烷细菌与沼气发酵. *生物学通报 (Bulletin of Biology)*, 1994, 29 (4) : 1-3.

Isolation and characterization of an *Enterococcus* strain from Tibetan alpine meadow soil

Lei Yang^{1,2}, Yu Deng², Hui Zhang², Qingyun Diao^{1*}

¹Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China

²Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China

Abstract: [Objective] We studied the physiological, biochemical properties and metabolism of *Enterococcus* strain CJ-1 from high-altitude soil in Namtso, Tibet. [Methods] Strain CJ-1^T was isolated from the soil of Namtso alpine meadow soil by Hungate anaerobic technique. Through physiological, biochemical and phylogenetic analysis, we identified the strain CJ-1. [Results] Strain CJ-1 was Gram-positive and facultative anaerobe, 1 – 1.5 μm in diameter. CJ-1^T was atrichia nonmotile cocci, and always occurred in pairs. CJ-1^T occurred in the presence of 0% – 7% NaCl (optimum at 5%), pH 5.0 – 8.5 (optimum 7.0) and temperature between 10°C and 50°C (optimum at 25°C). CJ-1 could metabolize many carbon sources including cellobiose, melezitose and ribose. Metabolites of cellobiose were lactic acid, acetic acid, propionic acid, butyrate, CO₂, and little H₂. The mol% G + C content of the genomic DNA was 39.2 mol%. 16S rRNA gene sequence analysis of the above strain showed the highest similarity of 95.9% with its closest phylogenetic neighbor *Enterococcus aquimarinus*. The strain can degrade cellobiose which act as intermediate metabolites in the methane fermentation process. [Conclusion] CJ-1^T can degrade cellobiose. CJ-1^T represents a novel species in the genus *Enterococcus*.

Keywords: *Enterococcus namtsoensis*, cellulose utilization, identify

(本文责编:王晋芳)