

五种假单胞菌的分离鉴定及其生物活性

张望月^{1#}, 高健^{2#}, 张超¹, 张友明¹, 胡胜标¹, 李岚岚¹, 孙运军¹, 丁学知¹, 夏立秋^{1*}

¹湖南师范大学生命科学学院, 微生物分子生物学国家重点实验室培育基地, 长沙 410081

²湖南科技大学生命科学学院, 湘潭 411201

摘要: 【目的】从湖南长沙市采集到的土样中分离假单胞菌并进行归类, 研究各菌株抑菌和抗肿瘤生物活性, 以丰富假单胞菌菌种资源并为微生物次级代谢物的挖掘奠定基础。【方法】采用大蜡螟诱集法诱集分离假单胞菌, 结合形态观察、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列同源性分析, 鉴定并归类各细菌, 通过平板扩散法、对峙培养法和肿瘤细胞毒性试验分别研究各菌株抑制细菌、拮抗真菌和抗肿瘤细胞等生物活性。【结果】从湖南长沙市郊区菜地、林地中分离得到 5 株假单胞菌, 归类并命名为 *Pseudomonas protegens* CY01、绿针假单胞菌 CY02 (*Pseudomonas chlororaphis* CY02)、栖稻假单胞菌 CY04 (*Pseudomonas oryzihabitans* CY04)、*Pseudomonas* sp. CY05 和恶臭假单胞菌 CY06 (*Pseudomonas putida* CY06)。*P. protegens* CY01 和 *P. chlororaphis* CY02 对枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 具有较好的抑菌效果, *P. chlororaphis* CY02 对水稻稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*) 具有良好的拮抗作用, 对小鼠黑色素瘤细胞 B16 具有较强的细胞毒性。【结论】分离得到的 *P. chlororaphis* CY02, 在抑制病原细菌、拮抗水稻稻瘟病菌和抗肿瘤细胞等方面具有显著效果。

关键词: 大蜡螟诱集法, 假单胞菌, 抗菌, 抗肿瘤

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 09-0957-09

大蜡螟诱集法是从土壤中分离昆虫病原线虫共生菌常用的方法, 结合鉴别培养基 NBTA, 能快速且准确地分离到发光杆菌 (*Photobacterium* sp.) 和致病杆菌 (*Xenorhabdus* sp.), 新分离出的昆虫病原线虫共生菌能特异吸收 NBTA 培养基中的溴麝香草酚蓝 (BTB), 形成蓝色菌落, 但在体外培养过程中, 该类细菌会发生形态变异, 丧失染料吸收能力, 却能氧化培养基中的红四氮唑 (TTC), 使菌落成红色^[1]。采用大蜡螟诱集法从土壤中分离细菌的过程中, 在

NBTA 平板上常生长有大量的红色菌落, 不具备昆虫病原线虫共生菌的典型特征, Grundmann 等人的研究表明新分离到的菌落呈红色的菌株大部分为假单胞菌^[2], 该方法也可用于具有潜在杀虫活性的假单胞菌的筛选。

假单胞菌在自然界分布广泛, 种类繁多, 是植物根际土壤周围起生物防治功能的主要细菌类群^[3]。目前, 世界各地对假单胞菌的应用研究有了大量的报道, 涉及领域包括用于农业生物防治、植物生长调

基金项目: 国家“973 项目” (2011CB111680); 国家自然科学基金 (31070006); 高校博士学科点专项科研基金 (20124306110006); 湖南省高校科技成果转化产业化培育项目基金 (10CY013)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-731-88872905; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

作者简介: # 对本文有同等贡献。张望月 (1987 -), 女, 湖南祁阳县人, 硕士研究生, 主要从事微生物菌种资源开发及微生物抗肿瘤方面的研究, E-mail: 2506660680@qq.com; 高健 (1975 -), 男, 湖南湘潭人, 博士, 主要从事微生物资源研究, E-mail: 515900890@qq.com

收稿日期: 2013-01-24; **修回日期:** 2013-04-14

节^[4]、环境保护^[5-6]和医药开发^[7]等,其中,在生物防治与促植物生长方面的研究最为透彻、应用最为广泛,生物防治主要作用对象为植物病原真菌^[8],如雪霉叶枯菌、镰刀菌、棉花黄萎病菌、炭疽菌等^[9-11]。另外,假单胞菌还可用于生物杀虫^[12],已分离到的具有杀虫活性的次级代谢产物有 oxazoles、鼠李糖脂等^[2, 13]。假单胞菌对植物生长的促进作用主要通过其产生的植物生长激素^[14]。在环境保护方面,假单胞菌主要被用于化学农药的降解、废水处理、油污处理等^[15-17]。假单胞菌用于医药方面的研究已有报道,国外较早时期有从假单胞菌中分离出具有抗肿瘤活性的大环类酯类化合物 Oximidines I 和 II^[18],并有利用假单胞菌外毒素与单克隆抗体结合抗肿瘤的报道^[19];在我国,早期分离到济南假单胞菌对肿瘤具有一定的抑制作用^[20],从怀地黄中分离到的绿针假单胞菌对食管癌细胞具有细胞毒性^[21]。

随着对假单胞菌的研究不断深入,特别是全基因组测序的完成,假单胞菌的许多生物功能得到开发与利用,在农业、环保和医药领域具有广阔的应用前景,从自然界中分离新的假单胞菌是充分利用该细菌的基础。本研究采用大蜡螟诱集法从土壤中分离得到 5 株假单胞菌,结合形态观察、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列同源性分析等分类鉴定方法,对 5 株细菌进行了分类与鉴定,并研究了各菌株的抑菌和抗肿瘤生物活性,为进一步的研究与应用奠定了重要基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土样:通过多点取样法从湖南长沙市郊区菜地林地采集得到。

1.1.2 供试昆虫:末龄大蜡螟 (*Galleria mellonella* L.),由本实验室饲养。

1.1.3 供试菌株:产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*)、枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、水稻稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*),本实验室保藏。

1.1.4 供试细胞株:小鼠黑色素瘤细胞 B16 (murine melanoma B16 cells),本实验室保藏。

1.1.5 培养基:LB 培养基^[2]、NBTA 培养基^[1]、KMB 培养基^[22]、PDA 培养基^[21]。

1.2 菌株分离

参照 Grundmann 等人^[2]菌株分离方法进行。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态观察:将分离得到的各菌株分别接种到 KMB 平板上,30℃ 培养 48 h,观察菌落形态,另将各菌株接种到 KMB 液体培养基中,30℃,180 r/min,培养 48-60 h,观察色素产生情况。从固体平板上取菌体,进行革兰染色并观察细菌形态。

1.3.2 生理生化特征观察:参照《常见细菌系统鉴定手册》^[22]方法进行。

1.3.3 16S rRNA 基因扩增、测序与构建系统发育树:以实验室已有 16S rRNA 基因通用引物,对各分离菌株进行菌落 PCR 扩增 16S rDNA,16S_F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',16S_R:5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。扩增总体积 30 μL,94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 0.5 min,58.5℃ 退火 0.5 min,72℃ 延伸 1.5 min,进行 30 个循环,72℃ 延伸 10 min。用北京百泰克生物技术有限公司多功能 DNA 纯化回收试剂盒对 PCR 产物进行回收,与 pMD18-T 载体连接,送由上海英骏生物技术有限公司完成测序。从 EzTaxon-e 数据库中获取与分离菌株亲缘关系较近的模式菌株 16S rRNA 基因,结合在 GenBank 中经 BLAST 获取到的菌株 16S rRNA 基因,运用 MEGA4.1 的 Kimura-2-Parameter 模型,采用邻接法 (NJ) 构建系统发育树 (Replications = 1000, Bootstrap 值取百分比)。

1.4 生物活性测定

1.4.1 抑制病原细菌:采用琼脂平板扩散法,检测 CY01、CY02、CY04、CY05 和 CY06 对供试病原细菌产气肠杆菌、枯草芽胞杆菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、绿脓杆菌和大肠杆菌的抑菌效果。分离菌株发酵培养 12 h、24 h、48 h、72 h 后,分离出菌液上清并 10 倍浓缩,各取 10 μL 用于抑菌试验。用游标卡尺检测抑菌效果:抑菌圈半径 (mm) = 抑菌圈半径 (mm) - 滤纸片半径 (mm)。其中金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、绿脓杆菌、大肠杆菌为人类病原细菌的安全等级三类,此实验在湖南省疾控中心微生物实验室 (三级生物安全等级实验室) 进行。

1.4.2 拮抗植物病原真菌:采用平板对峙培养法,在 PDA 平板中心位置接种植物病原真菌水稻稻

瘟病菌菌丝, 距离中心两侧各15 mm处划线接种各分离菌株, 28℃倒置培养7-15 d, 与对照组比较观察病原真菌生长效果, 并利用相差显微镜观察受拮抗作用的病原真菌菌丝; 将对峙培养15 d的受CY02拮抗水稻稻瘟病菌从菌落边缘到中心依次取3点挑取菌丝再接种于新的PDA平板上, 28℃倒置培养3 d, 观察病原真菌生长情况。

1.4.3 抗肿瘤细胞活性: 通过对肿瘤细胞形态进行观察和MTT法检测各分离菌株对小鼠黑色素瘤细胞的细胞毒性。在96孔板中接种B16细胞, 每孔 1×10^3 cells/90 μ L, 置于5% CO₂培养箱中, 37℃培养8-12 h, 分别加入10 μ L发酵培养24 h、48 h、72 h的各分离菌株培养液上清, 对照组加入等量的无菌KMB液体培养基, 每样品3孔平行, 培养24 h, 置于倒置显微镜下观察B16细胞生长情况和形态。用北京索莱宝科技有限公司MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测各样品对B16细胞的抑制率。

2 结果和分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态特征: 分离到的5个菌株均为革兰阴

性, 杆状, 运动, 不产芽胞。在NBTA平板上, 菌落均呈红色。在KMB平板上, CY01、CY04、CY05和CY06菌落圆形隆起, 边缘整齐, 湿润, 粘稠, 易挑起, 菌落初期透明, 后期脓状样, 菌落较大, 显不同程度的黄色; CY02菌落圆形中间凹陷, 边缘整齐, 较干, 粘度低, 易挑起, 初期呈白色, 渐成乳白色脓样, 后期呈紫黑色菌落。在KMB液体培养基中, CY01产亮黄色素, CY02产紫红色素, CY04、CY05和CY06产暗黄色素。

2.1.2 生理生化特征: 不同菌株生理生化特征表明各分离菌株符合假单胞菌的基本特征, 在甲基红试验和V. P. 试验中均呈阴性, 均具有氧化酶、精氨酸双水解酶、过氧化氢酶活性, 能还原硝酸盐, 不水解淀粉、乳糖, 不产生H₂S和吲哚, 能在4℃低温生长。此外, 不同分离菌株的耐高温、耐盐、脂酶活性、反硝化产气、降解酪氨酸、明胶水解、柠檬酸盐水解和PHB产生等生理生化特征存有差异(表1)。

2.1.3 系统发育树的构建: 分离菌株CY01、CY02、CY04、CY05和CY06和16S rRNA基因序列长度分别为1441 bp、1393 bp、1443 bp、1435 bp和1443 bp, 在NCBI上经BLAST分析, 结果表明各菌株均属于假单胞菌属, 分别与*Pseudomonas. protegens* Pf-5

表1. 生理生化特征

Table 1. Physiological and biochemical characteristics

Characteristics	CY01	CY02	CY04	CY05	CY06
Cell length (μ m)	2.00 - 2.45	1.71 - 3.21	1.70 - 3.06	1.25 - 1.60	1.79 - 3.19
width (μ m)	0.72 - 0.80	0.72 - 0.84	0.72 - 0.84	0.71 - 0.81	0.73 - 0.85
Growth at/with					
4℃	+	+	+	+	+
41℃	-	-	+	+	+
5% NaCl	-	-	-	+	+
Acid produced from glucose	+	+	+	+	+
Methyl red test	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer test	-	-	-	-	-
Activity of					
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
Lipase	-	+	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+
Gas production of nitrate reduction	+	+	-	+	-
Hydrolysis of					
Starch	-	-	-	-	-
Gelatin	+	+	+	-	-
Growth on sole carbon source					
Lactose	-	-	-	-	-
Citrate	-	+	+	-	-
Growth on sole nitrogen source					
L-tyrosine	+	+	-	-	-
Production of					
PHB	-	-	-	+	-
Indole	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-

+ : Positive reaction; - : Negative reaction

(NR_074599.1)、绿针假单胞菌 *P. chlororaphis* ENIB6 (JQ236624)、恶臭假单胞菌 *P. putida* NBRC 14671 (AB680647)、*P. alkylphenolia* KL28 (AY324319.1) 和恶臭假单胞菌 *P. putida* WH3

(FJ262368) 具有最高相似性, 序列相似性均大于 99%, 利用 MEGA4.1 的 Kimura-2-Parameter 模型, 运用邻接法 (NJ) 构建系统发育树如图 1 所示。

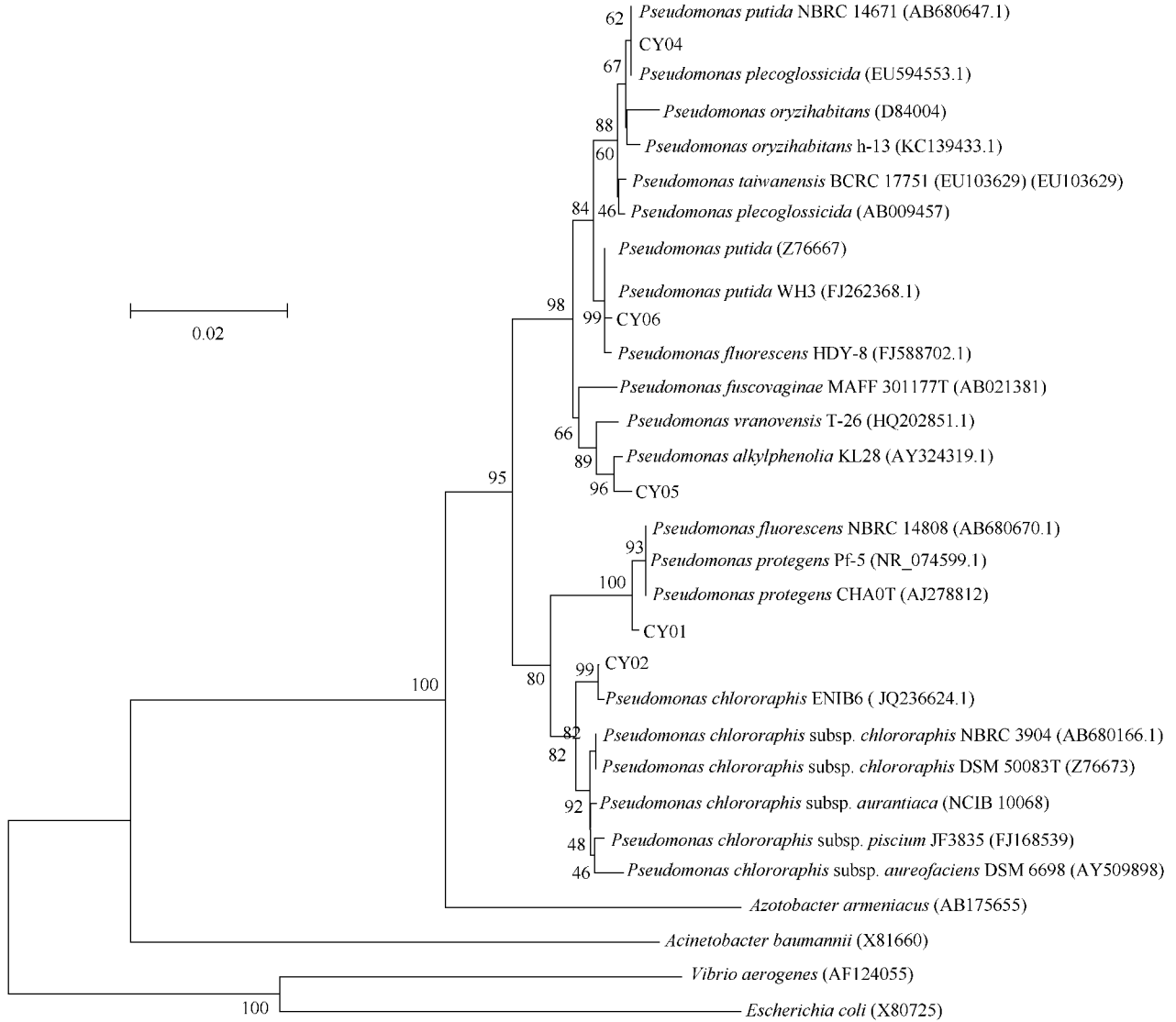


图 1. 根据 16S rRNA 基因序列构建系统发育进化树

Figure 1. The Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences. The numbers on branches indicate bootstrap values. The tree rooted was constructed by Kimura-2-Parameter model and N-J method with bootstrap values calculated from 1000 resampling. The numbers at each node that indicate the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets followed each bacterial name are 16S rDNA sequence accession numbers in GenBank.

在与各模式菌株的比较中, CY01、CY04、CY06 分别与模式菌株 *P. protegens* CHA0T (AJ278812)、*P. oryzihabitans* (D84004)、*P. putida* (Z76667) 的相似性最高, 分别为 98.82%、98.75%、98.40%, 且与各模式菌株属同一聚类, 可认为 CY01、CY04、CY06 分别属菌种 *P. protegens*、*P. oryzihabitans*、*P. putida*

中的一种, 命名为 *P. protegens* CY01、*P. oryzihabitans* CY04 和 *P. putida* CY06, 并提交该菌株 16S rRNA 基因序列至 GenBank, 获得的登录号分别为 JX082197、JX082200、JX082202; CY02 与模式菌株 *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* DSM 50083T (Z76673) 的相似性最高, 达 99.43%, 但 CY02 在系

统进化树上与各亚种模式菌株分离开来形成新的分枝,不能归属到 *P. chlororaphis* 中已鉴定的任何亚种,命名为 *P. chlororaphis* CY02, 该菌株 16S rRNA 基因序列在 GenBank 上获得的登录号为 JX082198; CY05 与模式菌株 *P. putida* (Z76667) 相似性较高,但在系统进化树上形成新的分枝,不归属为已鉴定到的任何种,且相似性为 95.89%, 小于 97%, 推测为一新种, 根据 BLAST 所得结果, 命名为 *Pseudomonas* sp. CY05, 提交该菌株 16S rRNA 基因序列至 GenBank 获得的登录号为 JX082201。

2.2 生物活性测定

2.2.1 抑制细菌生长活性: 抑菌结果表明(表 2), 菌株 CY01 在发酵培养 12–72 h, 各时间段均产生具有抑制革兰阳性菌金黄色葡萄球菌和枯草芽胞杆菌生长的代谢产物,并在发酵培养 48 h 时,具有最佳抑菌效果,但该菌株对其他供试病原菌无抑菌效果; 菌株 CY02 在培养 48 h 后,才产生具有抑制金黄色葡萄球菌和枯草芽胞杆菌生长的代谢产物,且对其他供试病原菌无抑菌活性。CY04、CY05 和 CY06 对各供试病原菌均不存在抑菌效果。

表 2. 抑制细菌生长的抑菌圈半径 (mm)

Table 2. The semidiameter of inhibition zone (mm)

The test bacteria	CY01 12 h	CY01 24 h	CY01 48 h	CY01 72 h	CY02 48 h	CY02 72 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1833 ± 0.08690	6.1983 ± 0.07975	5.9383 ± 0.05289	2.1717 ± 0.04041	2.1050 ± 0.04681	3.3417 ± 0.06631
<i>Bacillus subtilis</i>	2.9867 ± 0.07402	4.8767 ± 0.04579	3.9750 ± 0.07634	1.6167 ± 0.06080	3.7133 ± 0.06733	1.3567 ± 0.06080

Means and standard deviation in the column according to SPSS.

2.2.2 拮抗植物病原真菌: 从水稻稻瘟病菌在平板上的生长情况可以看出, CY02 对其具有较好的拮抗作用, 培养 7 d, 对照组中水稻稻瘟病菌能形成直径约 30 mm 的圆形菌落(图 2-A), 而在受 CY02 拮抗的实验组中, 生长受到抑制(图 2-B), 培养 15 d, 对

对照组中水稻稻瘟病菌能铺满整个平板, 菌落灰色蓬松(图 2-C), 实验组中 CY02 在水稻稻瘟病菌周围形成环状包围圈, 病原真菌生长受到抑制, 呈与生长初期相同的白色(图 2-D)。CY01、CY04、CY05 和 CY06 对水稻稻瘟病菌无拮抗作用。

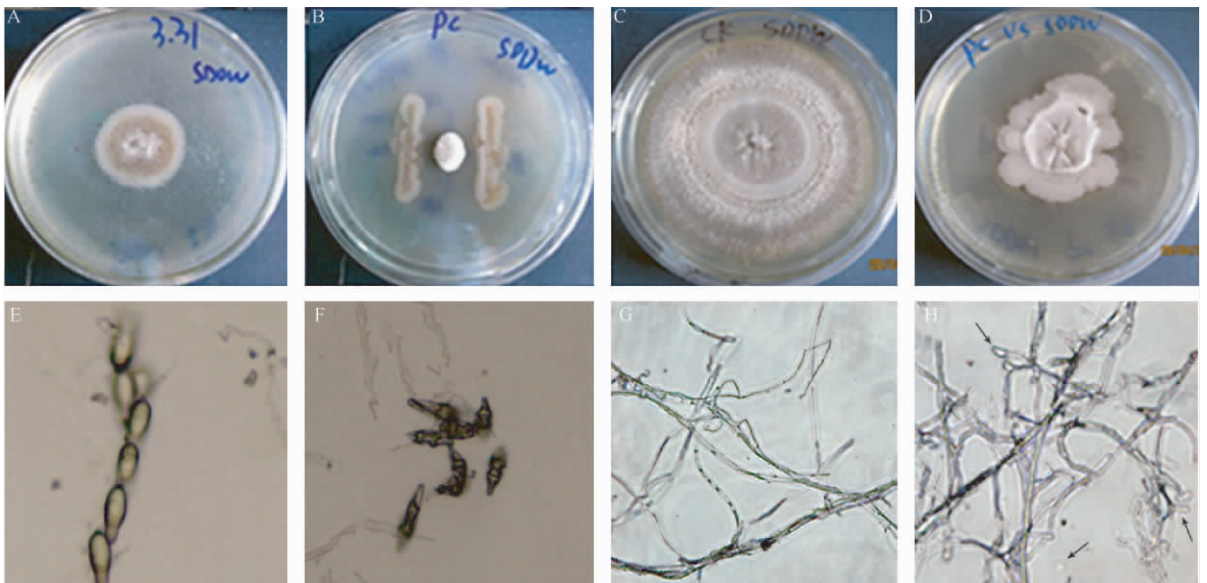


图 2. CY02 菌株对水稻稻瘟病菌的拮抗作用

Figure 2. The antagonistic action of strain CY02 against *Pyricularia oryzae*. A: The colonial morphology of *Pyricularia oryzae* cultured 7 days without antagonistic action; B: The colonial morphology of *Pyricularia oryzae* cultured 7 days with antagonistic action; C: The colonial morphology of *Pyricularia oryzae* cultured 15 days without antagonistic action; D: The colonial morphology of *Pyricularia oryzae* cultured 15 days with antagonistic action; E: The micrograph of *Pyricularia oryzae* spores without antagonistic action (400 ×); F: The micrograph of *Pyricularia oryzae* spores with antagonistic action (400 ×); G: The micrograph of *Pyricularia oryzae* hyphae without antagonistic action (400 ×); H: The micrograph of *Pyricularia oryzae* hyphae with antagonistic action (400 ×).

对水稻稻瘟病菌进行镜检观察,结果表明:对照组中分生孢子饱满正常(图 2-E),受 CY02 拮抗作用后,分生孢子干瘪畸形(图 2-F);对照组水稻稻瘟病菌菌丝体正常发育,隔膜明显,原生质分布合理(图 2-G),受 CY02 拮抗后,原生质浓缩,液泡化,外渗,菌丝肿胀畸形,隔膜不明显,并伴随有分解(图 2-H)。

对照组没有受拮抗的水稻稻瘟病菌再接种至 PDA 平板上能良好的生长,而受 CY02 拮抗作用后的水稻稻瘟病菌菌丝再接种于 PDA 平板上,没有表现出生长迹象(图 3),表明水稻稻瘟病菌完全被 CY02 侵染,从菌落中心到边缘的菌丝均不能恢复生长活性,而且 CY02 菌落在对峙培养中表现出定殖竞争优势。

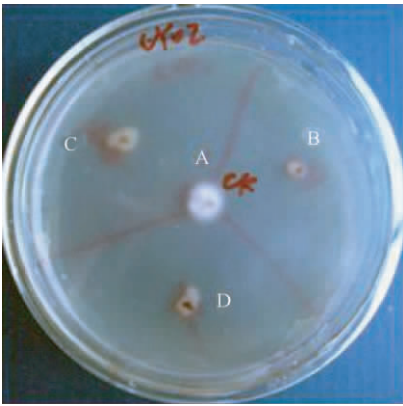


图 3. 受 CY02 菌株拮抗的水稻稻瘟病菌菌丝再接种 PDA 平板

Figure 3. The hyphae of *Pyricularia oryzae* antagonized by strain CY02 was transferred to PDA plate. A: The control group; B: The edge hyphae of *Pyricularia oryzae* colony with antagonistic action; C: The centre hyphae of *Pyricularia oryzae* colony with antagonistic action; D: The hyphae between the edge and center of *Pyricularia oryzae* colony with antagonistic action.

2.2.3 抗肿瘤活性: 小鼠黑色素瘤 B16 细胞培养液中加入各菌株不同时间发酵培养液上清培养 24 h, 观察细胞形态, CY01、CY04、CY05 和 CY06 处理实验组中 B16 细胞与对照组相比较无明显差异, 说明该 4 株菌不具备有小鼠黑色素瘤细胞毒性; 而 CY02 不同时间发酵培养液上清对 B16 细胞具有不同程度的细胞毒性, 表现为: 与对照组相比(图 4-A), 随着发酵培养时间的延长, B16 正常梭状贴壁细胞逐渐减少, 24 h 发酵液上清处理的 B16 细胞密度降低, 梭形拉长, 有不规则形态(图 4-B); 48 h 发

酵液上清处理的 B16 正常梭状贴壁细胞量更少, 大部分分散成泡状球形, 有凝结现象(图 4-C); 72 h 发酵液上清处理的 B16 细胞全部为成泡状球形细胞, 凝结成团, 不能观察到正常的梭状贴壁细胞(图 4-D)。

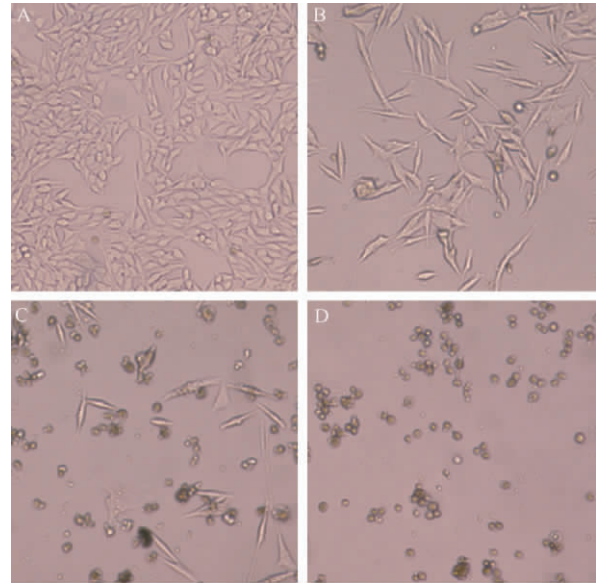


图 4. CY02 菌株不同培养时间上清对 B16 细胞的影响

Figure 4. The effect of strain CY02 supernatant with different culture time on B16 cells. A: B16 cells were treated with sterile KMB broth instead of strain CY02 supernatant; B: B16 cells were treated with strain CY02 supernatant cultured 24 h; C: B16 cells were treated with strain CY02 supernatant cultured 48 h; D: B16 cells were treated with strain CY02 supernatant cultured 72 h.

MTT 法测得各分离菌株对小鼠黑色素瘤 B16 细胞的抑制率, 结果表明 CY02 发酵培养 24 h、48 h 和 72 h 菌液上清, 对 B16 细胞生长抑制率分别为 62.2%、76.8% 和 91.5%, CY02 发酵培养 72 h 能产生具有较高抗肿瘤活性次级代谢产物, 其他各分离菌株抗肿瘤效果不明显(图 5)。

3 讨论

研究结果表明, *P. chlororaphis* CY02 在抑制病原细菌、拮抗水稻稻瘟病菌和抗肿瘤细胞方面有显著效果, 表明具有潜在的应用前景。 *P. chlororaphis* 目前已发现有 4 个亚种^[23-24], 分别为 *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis*, *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*, *P. chlororaphis* subsp.

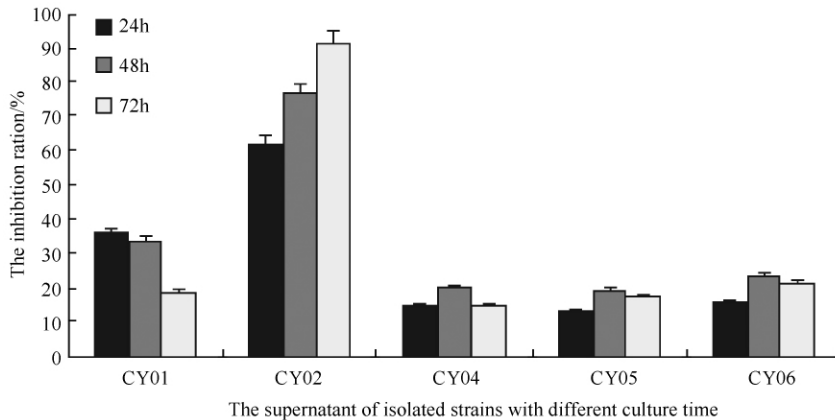


图 5. 各分离菌株不同培养时间上清对 B16 细胞的抑制率

Figure 5. The inhibition ratio of B16 cells treated with supernatant of isolated strains with different culture time.

aurantiaca 和 *P. chlororaphis* subsp. *Piscium*, 本研究中所分离到的 CY02 在 KMB 培养基上的菌落形态与已知 *P. chlororaphis* 各亚种存有较大差异, 且在根据 16S rRNA 基因序列构建的进化树中, CY02 与 *P. chlororaphis* 各亚种属同一聚类, 但形成新的分支, 推测 CY02 属于 *P. chlororaphis* 中的一新的亚种。 *P. protegens* CY01 在抑制制病原细菌方面具有一定的应用价值。 *P. protegens* 常用于植物病害防治, 长久以来将其划分为 *P. fluorescens*, Alban Ramette 等人基于分子和表型上的差异, 于 2010 年将 *P. protegens* 从 *P. fluorescens* 中划分出来并命名。 *P. protegens* 能特异性地产生抗菌化合物藤黄绿菌素 (Pyoluteorin, Plt) 和二乙酰间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, Plt), 对多种植物病原体具有致病性^[25-26], 并能产生氰化氢, 通过抑制呼吸链中的细胞色素氧化酶 C 对白蚁具有杀虫作用^[27]。

P. oryzihabitans CY04、*Pseudomonas* sp. CY05 和 *P. putida* CY06 在我们的各项生物活性研究中均没有明显的效果。菌种鉴定与分类结果显示, *Pseudomonas* sp. CY05 与亲源关系最近的已知模式菌株同源性比较, 相似性为 95.89%, 小于 97%, 推测为新种, 在 NCBI 中, BLAST 分析结果显示其与 *Pseudomonas* sp. 210_17 (GQ199719) 同源性比较, 有大于 99% 的相似性, *Pseudomonas* sp. 210_17 是 Mo Ming He 等人分离到的具有杀线虫活性的假单胞菌^[28], 推测该细菌可用于植物病原线虫的防治。

参考文献

- [1] Akhurst RJ. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *Journal of General Microbiology*, 1980, 121 (2): 303-309.
- [2] Grundmann F, Dill V, Dowling A, Thanwisai A, Bode E, Chantratita N, Ffrench-Constant R, Bode HB. Identification and isolation of insecticidal oxazoles from *Pseudomonas* spp.. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 2012, 8 749-752.
- [3] Weller DM, Raaijmakers JM, Gardener BB, Thomashow LS. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 2002, 40 (1): 309-348.
- [4] Santoyo G, Orozco-Mosqueda MDC, Govindappa M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 2012, 22 (8): 855-872.
- [5] Giri K, Rai JPN. Biodegradation of endosulfan isomers in broth culture and soil microcosm by *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil. *International Journal of Environmental Studies*, 2012, 69 (5): 729-742.
- [6] Rahman KS, Rahman TJ, McClean S, Marchant R, Banat IM. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology Progress*, 2002, 18 (6): 1277-1281.
- [7] Charyulu EM, Sekaran G, Rajakumar GS, Gnanamani A. Antimicrobial activity of secondary metabolite from marine

- isolate, *Pseudomonas* sp. against Gram positive and negative bacteria including MRSA. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2009, 47 (12): 964-968.
- [8] Olga VM, Nathalie W, Sawsan E, Christopher GT, Patricia AO. Suppression of Rhizoctonia and Pythium root rot of wheat by new strains of *Pseudomonas*. *Biological Control*, 2012, 62 (2): 93-102.
- [9] Jens PL, Thomas HE, Jolanta JL, Berndt G, Margareta H. Biological control of snow mould (*Microdochium nivale*) in winter cereals by *Pseudomonas brassicacearum*, MA250. *Biological Control*, 2008, 53 (4): 651-665.
- [10] George AB, Anastasia LL, Kalliopi K, Katina TK. Biological control of three *Colletotrichum lindemuthianum* races using *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 and *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Biological Control*, 2009, 49 (2): 139-145.
- [11] Erdogan O, Benlioglu K. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. *Biological Control*, 2010, 53 (1): 39-45.
- [12] Ruffner B, Péchy-Tarr M, Ryffel F, Hoegger P, Obrist C, Rindlisbacher A, Keel C, Maurhofer M. Oral insecticidal activity of plant-associated *pseudomonads*. *Environmental Microbiology*, 2013, 15 (3): 751-763.
- [13] Kim SK, Kim YC, Lee S, Kim JC, Yun MY, Kim IS. Insecticidal activity of rhamnolipid isolated from *Pseudomonas* sp. EP-3 against green peach aphid (*myzus persicae*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 59 (3): 934-938.
- [14] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63 (1): 541-556.
- [15] Fava F, Armenante PM, Kafkewitz D. Aerobic degradation and dechlorination of 2-chlorophenol, 3-chlorophenol and 4-chlorophenol by a *Pseudomonas pickettii* strain. *Letters in Applied Microbiology*, 1995, 21 (5): 307-312.
- [16] Yin H, Qiang J, Jia Y, Ye JS, Peng H, Qin HM, Zhang N, He BY. Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater. *Process Biochemistry*, 2009, 44 (3): 302-308.
- [17] Wang G, Chen H, Bi M, Li S. Bioremediation of chlorothalonil-contaminated soil by utilizing *Pseudomonas* sp. strain CTN-3. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, (3): 807-811. (in Chinese)
- 王光利, 陈宏宏, 毕萌, 李顺鹏. 假单胞菌菌株 ctn-3 对百菌清污染土壤的生物修复. *应用生态学报*, 2012, (3): 807-811.
- [18] Kim JW, Shin-Ya K, Furihata K, Hayakawa Y, Seto H. Oximidines I and II: Novel antitumor macrolides from *Pseudomonas* sp.. *The Journal of Organic Chemistry*, 1998, 64 (1): 153-155.
- [19] Pai LH, Batra JK, FitzGerald DJ, Willingham MC, Pastan I. Anti-tumor activities of immunotoxins made of monoclonal antibody B3 and various forms of *Pseudomonas* exotoxin. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of Americas*, 1991, 88 (8): 3358-3362.
- [20] Cai M, Lu D, Wang D, Fu Z, Wang J. A sarcoma-static new species of *pseudomonas*, *pseudomonas jinanensis* sp. nov.. *Acta Microbiologica sinica*, 1989, 29 (3): 155-160. (in Chinese)
- 蔡妙英, 路德硕, 王大帮, 付祖泽, 王吉昌. 对肿瘤有抑制作用的假单胞菌新种——济南假单胞菌. *微生物学报*, 1989, 29 (3): 155-160.
- [21] Yang Q, Xie Y, Zhang H, Li X. Isolation, identification and antagonism on microorganisms and cancer cells by active endophytes from *rehmannia glutinosa* libosch. *Microbiology China*, 2010, (10): 1467-1474. (in Chinese)
- 杨清香, 谢永生, 张昊, 李学梅. 怀地黄活性内生菌的分离鉴定及抗菌抗肿瘤活性. *微生物学通报*, 2010, (10): 1467-1474.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1999: 143.
- [23] Burr SE, Gobeli S, Kuhnert P, Goldschmidt-Clermont E, Frey J. *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *piscium* subsp. nov., isolated from freshwater fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60 (12): 2753-2757.
- [24] Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, Ramírez-Bahena MH, Mateos PF, Santa-Regina I, Rodríguez-Barrueco C, Martínez-Molina E, Velázquez E. Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57 (6): 1286-1290.
- [25] Haas D, Defago G. Biological control of soil-borne

pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3 (4): 307-319.

- [26] Ramette A, Frapolli M, Fischer-Le Saux M, Gruffaz C, Meyer J M, Défago G, Sutra L, Moëgne-Loccoz Y. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology*, 2011, 34 (3): 180-188.
- [27] Devi KK, Kothamasi D. *Pseudomonas fluorescens* CHAO

can kill subterranean termite *Odontotermes obesus* by inhibiting cytochrome c oxidase of the termite respiratory chain. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 300 (2): 195-200.

- [28] Li M, Wen F, Ying H, He MM, Qin XJ, Qing DY, Huang FD, Hui YS. A strategy to discover potential nematicidal fumigants based on toxic volatiles from nematicidal bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6 (31): 6106-6113.

Isolation, identification and characterization of five *Pseudomonas* strains

Wangyue Zhang^{1#}, Jian Gao^{2#}, Chao Zhang¹, Youming Zhang¹, Shengbiao Hu¹, Lanlan Li¹, Yunjun Sun¹, Xuezhi Ding¹, Liqiu Xia^{1*}

¹State Key Laboratory Breeding Base of Microbial Molecular Biology, College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

²College of Life Science, Hunan University of Science and Technology, Xiangtan 411201, China

Abstract: [Objective] We isolated *Pseudomonas* strains from soil samples collected from Changsha, Hunan province, catalogued them and studied the antimicrobial and antitumor activity. [Methods] We isolated *Pseudomonas* strains from soil samples through Galleria bait method, identified and catalogued the isolated strains according to morphological observation, physiological and biochemical characteristics and the homologous analysis of 16S rRNA sequences of nucleotides. Antimicrobial, antagonistic fungi and anti-tumor activities were studied by diffusion plate assay, dual-culture assay and cytotoxicity test respectively. [Results] We isolated 5 *Pseudomonas* strains from vegetable field and forest land of Changsha suburb, catalogued and named them as *Pseudomonas protegens* CY01, *Pseudomonas chlororaphis* CY02, *Pseudomonas oryzae* CY04, *Pseudomonas* sp. CY05 and *Pseudomonas putida* CY06 respectively. *P. protegens* CY01 and *P. chlororaphis* CY02 have antibacterial activity against *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *P. chlororaphis* CY02 has antagonistic activity against *Pyricularia oryzae* and anti-tumor cell activity against mouse melanoma B16 cells. [Conclusion] The isolated *P. chlororaphis* CY02 has a significant effect on pathogenic bacteria, *Pyricularia oryzae* and tumor cells.

Keywords: Galleria bait method, *Pseudomonas*, antimicrobe, anti-tumor

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2011CB111680), by the National Natural Science Foundation of China (31070006), by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20124306110006) and by the Science and Technology Achievements Breeding Program of Hunan Province University (10CY013)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-731-88872905; E-mail: xialq@hunnu.edu.cn

These authors contributed equally to this work.

Received: 24 January 2013 / Revised: 14 April 2013