

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (9) :1160 – 1170; 4 September 2015
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicroen
doi:10.13343/j.cnki.wsxb.20140542

一株分离自胡杨的赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus*) ML-64 的微生物学特性

努斯热提古丽·安外尔, 热孜亚·艾肯, 吾尔麦提汗·麦麦提明, 布阿依夏姆·阿木提, 努丽曼姑·司马义, 木合塔尔·阿布都克里木, 艾尔肯·热合曼*

新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046

摘要: 【目的】从胡杨茎秆液中分离得到的一株菌株 ML-64, 对其进行微生物学特性的分析。【方法】通过细菌培养和染色的方法进行了形态和培养特征的检测, 使用多相分类学方法测定菌株的各项生理生化指标, 脂肪酸组分、醌组分、极性脂类型、16S rRNA 基因系统发育分析、(G + C) mol% 含量的测定和 DNA-DNA 杂交分析。【结果】菌株 ML-64 为革兰氏阳性菌, 杆状, 产生芽孢。菌落为圆形, 淡黄色, 表面光滑。菌株生长温度范围为 10 – 45 °C (最适 37 °C), pH 范围为 7.0 – 9.0 (最适 pH7.0), NaCl 浓度范围为 0 – 6% (W/V) (最适 0 – 2%)。菌株 ML-64 的类脂酯酶, 精氨酸双水解酶, 脲酶活性和 VP-实验为阳性。在 API 50CH 酶活性检测实验中菌株不能发酵任何糖类。可利用的碳源有: L-丝氨酸, 丙酮酸甲酯, α -酮-丁酸, 乙酰乙酸。对多粘菌素 B (30 μ g)、新生霉素 (30 μ g)、青霉素 G (10 U) 不敏感。16S rRNA 基因序列分析结果表明, 菌株 ML-64^T 与 *Lysinibacillus chungkukjangi* 2RL3-2^T, *Lysinibacillus sinduriensis* BLB-1^T 有密切亲缘关系。相似率分别为 100% 和 99.1%。菌株 ML-64 与 *Lysinibacillus chungkukjangi* 2RL3-2^T 和 *Lysinibacillus massiliensis* CIP108446^T 之间的杂交率分别为 82% 和 50.9%。基因组 DNA (G + C) mol% 含量为 36.8%。菌株 ML-64 优势脂肪酸类型为 iso-C_{15:0} (55.05%) 和 anteiso-C_{15:0} (20.70%), 醌组分类型是 MK-7。【结论】基于表型特征、遗传型特征和系统发育分析, 将菌株定为 *Lysinibacillus chungkukjangi* 的新变种, 获得序列注册号为 KC609752。胡杨内生菌 ML-64 的基因组结构已与最近源菌株 *L. chungkukjangi* 产生了较大的分化, 选择性地适应了胡杨内生环境。

关键词: 赖氨酸芽孢杆菌属, 胡杨内生细菌, 多相分类学鉴定

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209 (2015) 09-1160-11

胡杨 (*Populus euphratica*) 是我国西北干旱半干旱地区内陆河流域唯一能够独自成林的乔木树种。对于干旱荒漠的极端气候生境具有高度适应能力^[1-2]。由于具有较强的耐干旱和盐碱能力, 承担

着维护荒漠区生态平衡的重要作用。深入进行胡杨内生菌的研究在维护胡杨林生态安全性和林地物种多样性等方面具有重要意义^[3]。Ugen 河位于天山南麓, 塔里木盆地中北部, 是由于塔里木河改道而干

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31060002, U1203101); 新疆维吾尔自治区科技支疆项目 (201091236)

* 通信作者。Tel: +86-991-8583450; E-mail: erkin1106@163.com

作者简介: 努斯热提古丽·安外尔 (1990 -), 女 (维吾尔族), 新疆乌鲁木齐人, 硕士研究生, 研究方向为资源微生物。

收稿日期: 2014-11-19; **修回日期:** 2015-03-15

枯 120 多年的古河道^[3-4]。河流面积 3408 km², 全年平均温度 10.7 °C, 年降水量 51.6 mm, 年平均蒸发量 9921.1 - 2863.4 mm, 海拔高度为 1007 - 1100 m^[4]。Ugen 河的胡杨林在该河道沿岸分布保存较完整, 受人类活动影响较少, Ugen 河与当今塔里木河距离较远, 与其它古河道之间有很大的沙丘荒漠, 完全脱离了塔里木河水系, 具有与周边地区呈现地理隔离的特点。河岸胡杨林早已丧失通过洪水散播种子来维持基因流畅及传播内生细菌的机制, 形成在时间和空间上相对封闭的生态体系^[5]。植物内生菌是一种新的微生物资源, 具有潜在的应用价值。人们发现植物体内存在大量有益的内生细菌和内生真菌, 内生菌对植物病害的生物防治作用及开发应用引起了科学家的广泛关注和重视^[6]。植物内生菌代谢产物种类繁多, 结构多样并具有各种生物学活性, 主要有萜类、生物碱、皂苷类、芳香类、多肽类等^[7]。这些代谢产物不仅能促进植物生长、固氮、抗疾病、抗害虫和提高宿主植物抗逆境能力, 而且还有些物质有着抗肿瘤、抗病毒和抗菌作用^[7-8]。

Lysinibacillus 属目前包括 16 个被描述的种: *L. bronitoleram*, *L. sphaericus*, *L. fusiformis*^[9], *L. parviboronicapiens*^[10], *L. xylanilyticus*^[11], *L. massiliensis*, *L. odysse*, *L. sinduriensis*^[12], *L. macroides*^[13], *L. mangiferihumi*^[14], *L. meyeri*^[15], *L. contaminans*^[16], *L. chungkukjangi*^[17], *L. manganicus*^[18], *L. pakistanensis*^[19], *L. tabacifolii* (Duan et al. 2014)^[20]。*Lysinibacillus* 属的物种分离自土壤, 人类脑脊髓液, 宇宙飞船表面, 潮滩沉积物等各种环境^[17]。该属的所有菌种共同特点为能够产生孢子, 运动杆状, 细胞壁肽聚糖类型为 A4 α -type (Lys-Asp), 主要脂肪酸类型为 iso-C_{15:0} 或者 anteiso-C_{15:0}。呼吸醌类型为 MK-7。*Lysinibacillus* 属的菌株的极性脂组分有双磷脂酰甘油 (DPG)、磷脂酰甘油 (PG)、磷脂酰乙醇胺 (PE) 和磷酸类脂 (PL)^[17]。国内前人报道过有关 *Lysinibacillus* 属一些菌株的生物降解作用的研究, 此类研究显示这些菌株具有一定的降解甲酚、硫化钠等污染物的作用^[21-22]。本研究是首次对从胡杨茎秆液中分离得到的 *Lysinibacillus* 属菌株进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 菌株及培养基

菌株 ML-64 是从 Ugan 河废弃古河道胡杨林胡杨茎秆液中分离筛选得到的。模式菌株 *L. xylanilyticus* XDB9^T (= KCTC13423^T), *L. massiliensis* CIP 108446^T (= KCTC13178^T), *L. dyssey* NBRC 100172^T (= KCTC 3961^T), *L. chungkukjangi* (= KCTC 2RL3 - 2^T) 购自韩国典型培养物保藏中心。

(1) TSB 培养基 (g/L): 酪蛋白胨 17, 磷酸二氢钾 2.5, 大豆蛋白胨 3, 氯化钠 5, 葡萄糖 2.5, 琼脂粉 20, 蒸馏水 1 L。除葡萄糖外, 取上述成分混合, 微温溶解, 调 pH 值至 7.0, 煮沸, 加入葡萄糖溶解后, 摇匀, 滤清, 调节 pH 值使高压灭菌后为 7.3 \pm 0.2。

(2) R2A 培养基: R2A 培养基购自 Difco 公司。

1.2 形态和培养特征研究^[23]

菌落形态和细胞形态: 将菌株在 LB 培养基上 37 °C 下培养 2 d 后观察菌落大小、形状、颜色和表面特征。并通过染色用光学显微镜和扫描电镜观察菌株的细胞形态。

运动性观察: 将菌株在半固体培养基上直针穿刺接种, 37 °C 培养 24 h 后观察生长状况。若细菌只生长在穿刺线上, 边缘十分清晰, 表示实验菌无运动性, 而生长物由穿刺线向四周呈云雾状扩散, 表示菌株具有运动特性。

盐度试验: 将 0.5% 的细菌培养物接种在含 1%、2%、3%、4%、5%、6% 和 7% NaCl (W/V) 的 LB 液体培养基中, 每一浓度的液体培养基做 3 个平行样, 37 °C 培养 24 h 后在 600 nm 下测定 OD 值。

温度试验: 将 0.5% 的细菌培养物接种在 LB 液体培养基上, 分别在 5、10、20、25、28、30、35、37、40、45、50 和 55 °C 下培养, 每个温度梯度下做 3 个平行样, 观察其生长状况并在 600 nm 下测定 OD 值。

耐旱性实验: 用 PEG6000 (聚乙二醇) 形成模拟干旱环境, 将 0.5% 的细菌培养物接种到 PEG6000 质量浓度为 5、10、15、20、25、30、35 g/100 mL 的 LB 液体培养基中, 每一浓度的液体培养基做 3 个平行样, 37 °C 培养 48 h 后在 600 nm 下测定 OD 值。

pH 试验: 将 0.5% 的细菌培养物接种到 pH 值分别调至 5、6、7、8、9、10、11 的 LB 液体培养基中, 每个梯度都做空白对照和 3 个平行样, 37 °C 培养 48 h

后 560 nm 下测定 OD 值。

硼耐受性检测实验:将 LB 液体培养基上生长 1 d 的培养物涂布在分别含有 0、25、50、75、100、150 mol/L 硼酸的 LB 固体培养基上 37 °C 培养 2 - 3 d, 观察并记录生长状况。

1.3 生理生化特征^[24-25]

API 50CH、API 20E 和 API ZYM 根据 API 试剂条的说明指导书进行实验,测定菌株的各项生理生化指标。

氧化酶活性检测:用四甲基对苯二胺 1% 水溶液浸湿滤纸片后,取新鲜活化的细菌培养物涂布在浸湿的滤纸上,在 10 s 内出现紫罗兰色或紫色者为阳性;10 - 60 s 内出现紫罗兰色或紫色者为延迟反应;60 s 以上出现反应或不反应者为阴性。

过氧化氢酶活性检测:将菌株接种到 LB 平板或斜面,37 °C 培养 24 h 后取一环菌涂布于载玻片上,滴一滴 30% 的过氧化氢。立即出现气泡者为阳性,30 s 后不产生气泡者为阴性。

淀粉酶活性检测:普通 LB 培养基中加入 0.2% 的可溶性淀粉,121 °C 蒸汽灭菌 20 min 倒平板备用。取新鲜菌种点种于平板上,30 °C 培养 2 - 5 d,形成明显菌落后,在菌落周围滴加新鲜的碘液,观察菌落周围是否出现无色透明圆圈。

Biolog 生理生化特征检测:在平板上按照常规方法划线菌株 ML-64,37 °C 培养 2 d,用棉签挑到接种液 (IF)³ 中,配成指定细胞浓度的菌悬液。将菌悬液按每孔 100 μL 的量加到 Gen III 板后孵育,以便微生物代谢后产生表型指纹图谱。所有的孔在刚开始的时候都是无色的。当孵育一段时间之后,那些能被细胞利用碳源的孔中的呼吸作用增强了。增强的呼吸作用导致四唑氧化还原染料被还原,变成紫色。而阴性孔则保持无色。孵育后,通过显紫色孔所产生的表型指纹同 Biolog 数据库中的数据进行比较。

抗生素敏感性检测:将 LB 液体培养基上生长 1 d 的培养物涂布在培养基平板上,再用无菌镊子在平板上放入 8 mm 直径的圆盘药敏纸片。37 °C 培养 2 - 3 d,观察并记录药敏纸片周围的抑菌圈大小。测定的抗生素类型有:强力霉素 (30 μg)、洁霉素 (2 μg)、氨苄青霉素 (10 μg)、氯霉素 (30 μg)、萘啶酸 (30 μg)、利福平 (5 μg)、新霉素 (30 μg)、链霉素 (10 μg)、四环素 (30 μg)、多粘菌素 B (300 IU)、万

古霉素 (30 μg)、红霉素 (15 μg)、羧苄青霉素 (100 μg)、庆大霉素 (10 μg)、卡那霉素 (30 μg) 和青霉素 G (10 IU)。

1.4 细胞化学组分的测定

1.4.1 脂肪酸成分分析^[26-27]:参照 Sasser (1990) 的方法,通过气相色谱仪,使用美国 MIDI (Microbial Identification) 公司 Sherlock 全自动细菌鉴定系统对实验菌株进行菌体脂肪酸成分分析。色谱条件为:氢火焰,检测器温度为 300 °C;色谱柱为 7G 3.2 - 3.6;固定相为 DEGS;汽化室温度为 250 °C;柱温为 170 °C;载气为 N₂:30 mL/min;H₂:30 mL/min;空气:400 mL/min;进样量为 0.5 μL。

1.4.2 醌组分分析^[28]:参照 Collins 等的方法进行醌组分的提取和分析。反相高压液相色谱柱为十八烷基硅烷柱 (ODS 5 μm, 250 mm × 4.6 mm) 进样量为 20 μL,流动相是甲醇:异丙醇 (2:1) 溶液,流速是 1.00 mL/min,柱温是 40 °C,240 nm 和 270 nm 紫外检测,使用的是 Water Epower 软件完成,测定记录数据。根据标准条件不同的醌组分与洗脱时间的关系,结合标准菌株的校正值,分析试验菌株的醌型。

1.4.3 细菌细胞膜极性脂的分析^[29-30]:根据 Tindall 等描述的两相分层法,使用硅胶薄层色谱板 (gel TLC) 进行磷脂类脂的提取,纯化及组分分析。材料为 Merck 公司 Silica gel 60 板 (10 × 20 cm)。第一相展层剂,氯仿:甲醇:水 = 65:25:4。第二相展层剂,氯仿:冰醋酸:甲醇:水 = 80:15:12:4。展层完后吹干,距离板 10 - 12 cm 处用喷瓶气雾状喷显色剂显色 (显色剂为 0.1% 磷钼酸试剂,茚三酮试剂,α-萘酚试剂和钼蓝试剂),110 °C 加热 5 - 8 min,待板冷却后,扫描或照相。

1.5 遗传型特征的分析

微生物鉴定的遗传特征分析包括 16S rRNA 基因系统发育分析,(G + C) mol% 含量的测定和 DNA-DNA 杂交分析。

DNA 提取参照刘刚^[31] 等的方法进行。16S rRNA 基因扩增采用细菌通用引物^[32] 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行。PCR 反应体系 (50 μL):DNA 模板约 0.8 μL,10 × PCR 缓冲液 5.0 μL,10 mmol/L 的 P1 和 P2 各 0.8 μL,dNTP (10 mmol/L) 4 μL,Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/laL) 0.6 μL,加灭菌双蒸水至 50.0 μL。PCR 反应条件:

94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。反应结束后, 取 2 - 3 μL PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检测。PCR 产物送到上海生物工程有限公司进行 16S rDNA 完整长度测序。

测序结果 Ezbiocloud (EzTaxon-e server) 和 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>) 上进行分析。用 Clustal X 进行多序列比对^[33], 系统进化矩阵根据 Kimura 模型^[34] 估算, 用 MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件采用邻接法^[35] (Neighbor-Joining) 聚类分析, 并构建出系统进化树。

DNA-DNA 杂交率检测和 G + C mol% 含量的测定委托中国工业微生物保藏中心 CICC 分别根据 DeLey 的复性速率法^[36] 和 Mannur 的热变性法^[37] 来完成。

2 结果

2.1 形态学特征

菌株 ML-64 在 TSA 固体培养基上, 37 °C 下培养 48 h 后, 形成直径为 2.0 - 4.0 mm 圆形, 表面光滑的淡黄色菌落。在显微镜下观察菌株细胞形态为杆状, 产生芽孢, 革兰氏阳性, 穿刺实验显示穿刺线边缘清晰证明该菌不具有运动性 (图 1)。

2.2 细菌生长特征

菌株 ML-64 在含有 0%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、4.0%、5.0%、6.0% 的 NaCl 的培养基上能生长, 最适盐浓度为 0 - 2.0% (图 2-A)。在 LB 液体培养基 10、20、25、28、30、37、40、42、45 和 50 °C 下能够生长, 最适生长温度为 37 °C (图 2-B)。在 PEG6000 质量浓度为 5、10、15、20 和 25 g/100 mL

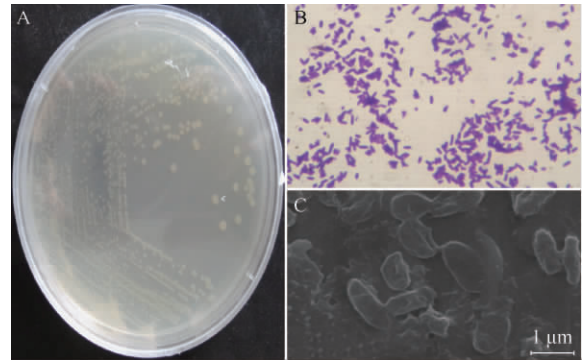


图 1. 菌落和细胞形态

Figure 1. Characteristics of strain ML-64 (A: strain ML-64 on TSA medium; B: microscopical characteristics of strain ML-64 (B, bar 10 μm); C: cell morphology of ML-64 under the scanning electron microscope (C, bar 1 μm)).

的 LB 液体培养基中能生长 (图 2-C), 表明该菌株有一定的耐干旱能力。菌株 ML-64 在 pH 分别为 7、8、9 的培养基上能生长, 最适生长 pH 为 7。硼耐受性检测结果表明, 菌株 ML-64 能在分别含有 0、25、50 mol/L 硼酸的 LB 固体培养基上生长。而硼酸浓度为 75 mol/L 时菌株不能生长。

2.3 生理生化特性

菌株 ML-64 API ZYM、API 20E 和其它酶学活性测定结果显示: 菌株 ML-64 具有碱性磷酸酶, 类脂酯酶, 酸性磷酸酶, 萘酚-AS-BI-磷酸水解酶, α-半乳糖苷酶, β-半乳糖苷酶, β-葡萄糖苷酶, 精氨酸双水解酶, 脲酶, 色氨酸脱氨酶, 氧化酶, 过氧化氢酶活性。能水解明胶, VP-实验为阳性。菌株 ML-64 和相关模式菌株的酶活性详细结果见表 1。在 API 50CH 实验中菌株 ML-64 和模式菌株不能发酵任何一种糖类。此结果与前人所研究的 *Lysinibacillus* 属的其它菌种的 API 50CH 实验结果一致。菌株 ML-64 经用 Biolog 鉴定系统生理生化测定, 结果表明菌

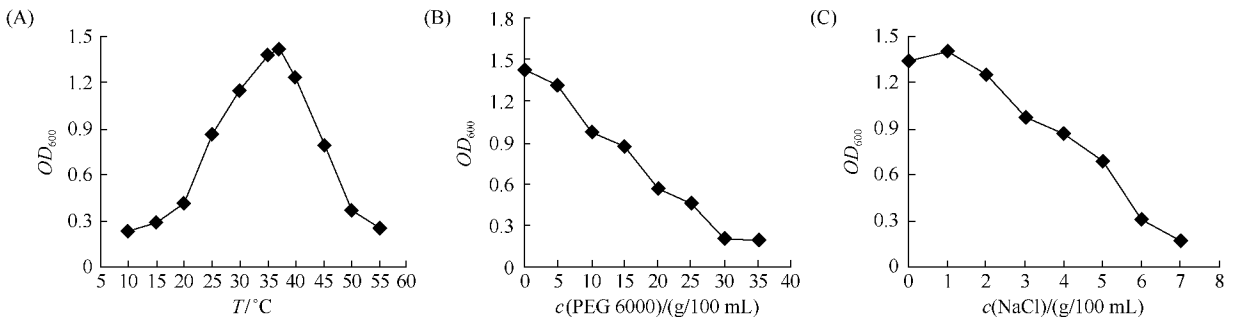


图 2. 菌株 ML-64 菌株在条件下的生长情况

Figure 2. Effect of temperatures (A), PEG6000 (B) and sodium concentration (C) on the growth of strain ML-64.

株可利用的碳源有:L-丝氨酸、丙酮酸甲酯、 α -酮-丁酸和乙酰乙酸。

抗生素敏感性检测结果表明,菌株 ML-64 对多粘菌素 B (30 μg)、新生霉素 (30 μg)、青霉素 G (10 U) 不敏感;而对羧苄青霉素 (100 μg)、氨苄青霉素 (10 μg)、万古霉素 (30 μg)、四环素 (30 μg)、链霉素 (10 μg)、氯霉素 (30 μg)、庆大霉素 (10 μg)、卡那霉素 (30 μg) 和林可霉素 (2 μg) 敏感。

表 1. 菌株 ML-64 和亲缘菌株的部分生理生化特征

Table 1. Differential characteristics of strain ML-64 and related members of the genus *Lysinibacillus*

Strains	ML-64	<i>L. chungkukjangi</i>	<i>L. massiliensis</i>	<i>L. xylanilyticus</i>	<i>L. odysseyi</i>
Growth in 5% NaCl	+	-	+	+	+
Temperature range	10 - 50	10 - 45	25 - 45	10 - 40	25 - 42
Alkaline phosphatase	+	+	-	-	-
Esterase	-	-	+	-	-
Lipid esterase	+	-	+	-	-
Cystine aromatic amine enzymes	-	-	-	+	-
Acid phosphatase	+	+	+	+	+
Naphthol-AS -BI -phosphoric acid hydrolase	+	+	+	+	+
α -galactosidase	+	+	+	-	+
β -galactosidase	+	+	+	-	-
α -Glucosidase	-	-	+	+	+
β -Glucosidase	+	+	+	-	-
N-acetyl glucosamine - enzyme	-	-	-	+	-
α -mannosidase	-	-	+	+	-
β -fucosidase	-	-	+	+	+
Arginine double enzyme hydrolysis	+	-	+	+	+
Urease	+	-	+	+	+
Citrate utilization	-	-	-	+	+
VP	+	w	-	+	+
Gelatin	+	+	-	+	+

+ :Positive; - :Negative.

表 2. 菌株 ML-64 和 *Lysinibacillus* 属相关模式菌株的细胞脂肪酸

Table 2. Cellular fatty acid contents of strain ML-64 and closely related members of the genus *Lysinibacillus*

Fatty acid	ML-64	<i>L. chungkukjangi</i>	<i>L. massiliensis</i>	<i>L. xylanilyticus</i>	<i>L. odysseyi</i>
iso-C _{14:0}	1.44	6.9	2.86	3.38	6.77
iso-C _{15:0}	55.05	7.5	59.71	65.10	31.53
anteiso-C _{15:0}	20.70	47.3	5.84	2.78	5.58
C _{16:1} w7c alcohol	1.15	2.2	2.67	11.59	21.29
iso-C _{16:0}	4.24	16.3	16.98	4.14	22.93
C _{16:1} w11c	1.48	1.0	0.45	1.57	3.29
C _{16:0}	3.70	4.5	2.44	0.41	1.29
iso-C _{17:0}	3.61	-	5.68	2.37	2.94
anteiso-C _{17:0}	5.61	11.3	2.33	0.64	1.44
iso-C _{17:1} w10c	0.38	-	0.34	4.86	1.24
Summed feature	0.36	-	-	1.19	0.48

2.4.2 细胞醌组分:微生物的呼吸醌是能量代谢过程的电子传递体,不同的微生物含有不同种类和分子结构的醌类型,因此,微生物醌的组成在一定程度上

2.4 细胞化学组分

2.4.1 细胞脂肪酸组分分析结果显示:菌株 ML-64^T主要包含的脂肪酸类型是 iso-C_{15:0} 和 anteiso-C_{15:0}。菌株 ML-64 跟 *L. massiliensis*、*L. xylanilyticus*、*L. odysseyi* 一样, iso-C_{15:0} 的含量最多 (55.05%); 菌株 *L. chungkukjangi* 中含量最多的优势脂肪酸 anteiso-C_{15:0}, 在菌株 ML-64 中则是第二个优势脂肪酸 (20.7%)。具体成分的测定结果如表 2 所示。

上可以反应微生物的差异性。实验结果表明,菌株 ML-64 含有的醌型为甲基萘醌-7 (MK-7), 跟 *Lysinibacillus* 属的其他菌株的呼吸醌类型一致。

2.4.3 细胞极性脂类型分析:菌株 ML-64 的主要极性脂类型为一个双磷脂酰甘油(DPG),一个磷脂酰甘油(PG),一个磷脂酰乙醇胺(PE),两个磷酸类脂(PL)和少许类脂出现。与该属其他鉴定过的有效发表物种极性脂类型一致(图3)。

2.5 遗传型特征

对菌株 ML-64 的 16S rRNA 基因 PCR 扩增产物进行测序,获得了 1517 bp 的全序列。将序列提交到 GenBank 数据库注册,获得序列注册号为 KC609752。与 GenBank 数据库序列进行 BLAST 比对,菌株 ML-64 与 *L. chungkukjangi*、*L. sinduriensis*、*L. massiliensis* 和 *L. odysseyi* 的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 100%、99.1%、97.14%、97.11%。并调聚与该菌株同源性的典型菌株序列,采用邻近法构建 16S rRNA 基因序列的系统进化树(图4)。菌株 ML-64 与 *L. chungkukjangi*、*L. sinduriensis*、*L.*

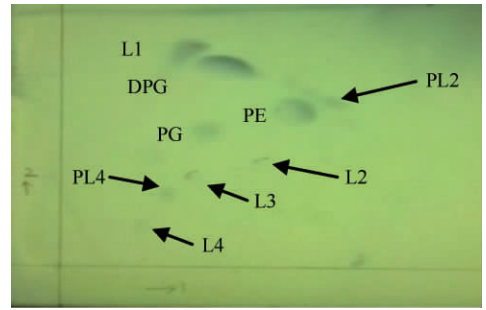


图 3. 菌株 ML-54 的脂肪酸类型图

Figure 3. Polar lipid profiles after separation by two-dimensional TLC. DPG, diphosphatidylglycerol; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidyl-ethanolamine; PL1-5, unidentified phospholipids; L1-4, unidentified lipid.

massiliensis 和 *L. odysseyi* 系统发育关系密切,尤其是菌株 ML-64 与 *L. chungkukjangi* 遗传距离最小,以 99% 的自展支持率聚类于同一个亚分支上。这结果表明菌株 ML-64 与 *L. chungkukjangi* 的 16S rRNA 基

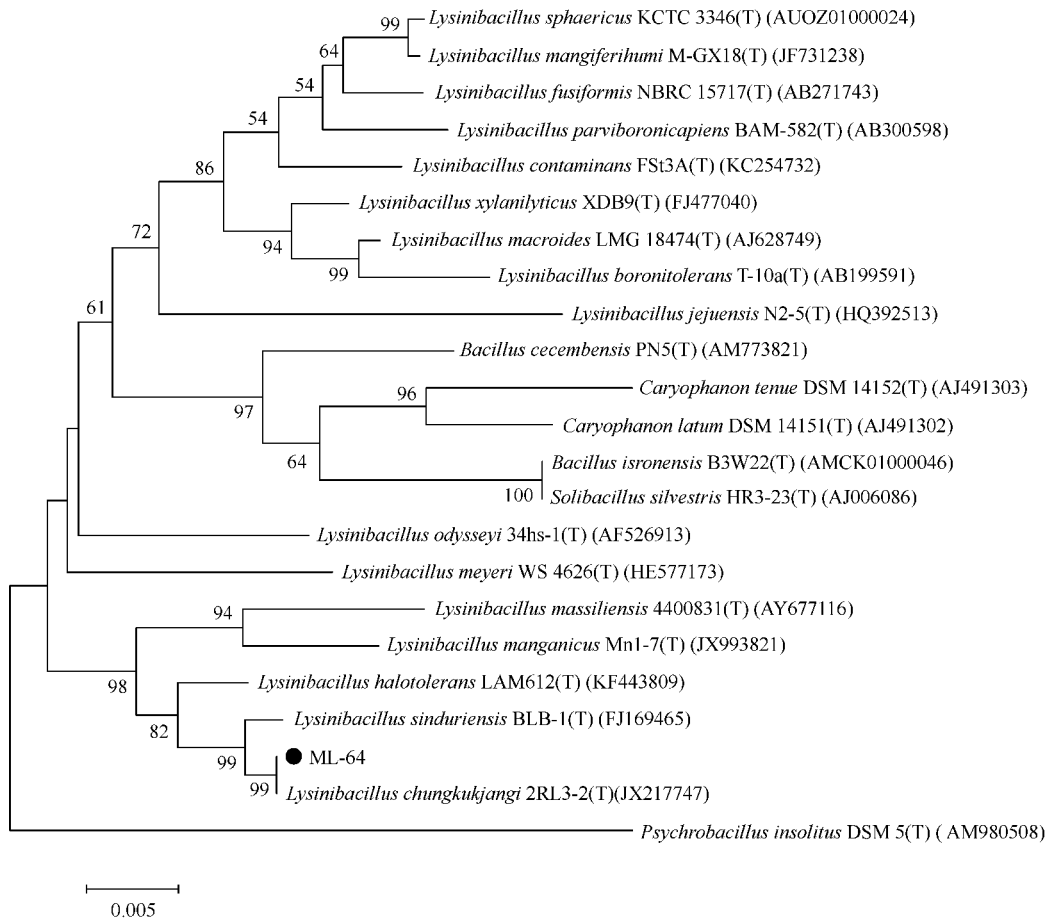


图 4. 用邻近相连法构建的系统进化树

Figure 4. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The GenBank accession numbers are given in parentheses; Numbers at branching points are bootstrap values; Bar, 0.005 substitutions per nucleotide position; Evolutionary analyses were conducted in MEGA 4.0.

因序列高度保守,未发生异化。

菌株 ML-64 DNA 的解链温度为 69.1 °C,按公式计算出菌株 ML-64 的 G + C mol% 含量为 36.8%。DNA-DNA 分子杂交实验结果表明,菌株 ML-64 与 *L. chungkukjangi* 2RL3-2^T 和 *L. massiliensis* CIP108446^T 之间的杂交率为 82.0% 和 50.9%,而与 *L. xylanilyticus* XDB9^T 之间的杂交率为 22.2%。该杂交数据表明,菌株 ML-64 与 *L. chungkukjangi* 2RL3-2^T 属于同一个物种,但基因组结构上已产生较大的分化。

3 讨论

Lysinibacillus 属的各种分离自多种环境。菌株 ML-64 是从 Ugan 河废弃古河道胡杨林胡杨茎秆液中分离筛选得到的胡杨内生菌。Ugan 废弃古河道(断流废弃 126 年)沿岸胡杨分布密度较高,断流年代比较久远,形成了在时间和空间上相对隔离封闭的生态体系统^[38]。鉴定结果表明,菌株 ML-64 有着与 *Lysinibacillus* 属成员一致的表性特征,例如:菌落圆形,表面光滑整齐,细胞形态为短杆状,能产生芽孢,革兰氏阳性;呼吸醌,极性脂与优势脂肪酸组分均与 *Lysinibacillus* 属的其他菌种具有高度的一致性。菌株 ML-64 与 *L. chungkukjangi*、*L. sinduriensis*、*L. massiliensis*、*L. xylanilyticus* 之间的 16S rRNA 相似率分别为 100%、99.01%、97.14%、97.11%。用邻近法、最大相似法和最大简约法(本文省略)构建的进化树上菌株 ML-6 与 *L. chungkukjangi* 以 99% 的靴带值聚类在同一分支上,表明 ML-64 与 *L. chungkukjangi* 的 16S rRNA 基因高度保守未发生异化。ML-64 与 *L. chungkukjangi* 2RL3-2^T 之间的基因组杂交率为 82%,高于鉴定一个新种的杂交率阈值 70%。ML-64 的基因组(G + C) mol% 含量为 36.8%,低于菌株 *L. chungkukjangi* 2RL3-2^T 的(G + C) mol% 含量(41.8%),这组数据揭示这两个菌株虽隶属于同一个物种,但在基因组结构水平上已产生了较大的异化。由于菌株 ML-64 的生存环境不同,在环境条件的胁迫下选择了不同的适应性与进化途径,基因组结构已产生了较大变异。

菌株 ML-64 与 *L. chungkukjangi* 在最适生长温

度、盐浓度、其他生理生化等方面都表现出了较大的差异。虽然菌株 ML-64 与 *L. chungkukjangi* 生长温度范围均为 10 - 45 °C,但 *L. chungkukjangi* 的最适生长温度为 30 °C^[17],ML-64 的最适生长温度为 37 °C(图 2-C)。*L. chungkukjangi* 的盐浓度生长范围 0 - 3%,最适盐浓度为 0%^[17];ML-64 的盐浓度生长范围是 0 - 6%,最适盐浓度为 0 - 2%,对盐的耐受性有较大幅度的增强。这一趋势也在这两个菌株的脂肪酸组分和优势脂肪酸的类型与比例上有所反映(表 2)。脂肪酸主要构成细胞双层膜结构,在调节细胞的渗透压与物质和能量代谢方面起着关键性作用。*L. chungkukjangi* 的优势脂肪酸是 anteiso-C_{15:0} (47.3%)、iso-C_{16:0} (16.3%) 和 anteiso-C_{17:0} (11.3%),ML-64 的优势脂肪酸为 iso-C_{15:0} (55.05%) 和 anteiso-C_{15:0} (20.7%)。ML-64 在 PEG6000 质量浓度为 5 - 25 g/100 mL 的 LB 液体培养基中能生长(图 2-C),脂肪酸组分及细胞膜通透性能上的变化可能是 ML-64 具备一定抗旱能力的成因。ML-64 与 *L. chungkukjangi* 在类脂酯酶(C8)、精氨酸双水解酶活性和 VP 实验有明显的差异(表 1)。上述生理生化特征上的差异进一步揭示了 ML-64 在基因组结构上与 *L. chungkukjangi* 已产生了较大程度的异化,ML-64 选择性地适应了胡杨内生环境。

菌株 ML-64 在生理生化特征上与 *Lysinibacillus* 属保持了较高的一致性,虽然和该属的其他菌株及 *L. chungkukjangi* 存在一定的差异,但与 *L. chungkukjangi* 具有最高的相似性。在分子遗传学特性上,ML-64 与 *L. chungkukjangi* 的 16S rRNA 基因序列表现出 100% 的相似性,然而在基因组(G + C) mol% 与基因组杂交率上都产生了较大幅度的变异。二者的基因组杂交率仅为 82%,没有低于不同种的杂交阈值 70% 这一界限。因此将菌株 ML-64 定为 *L. chungkukjangi* 的新变异种。菌株 ML-64 的 16S rDNA 序列注册号为 KC609752。

胡杨是生命力很强的植物,在寒冷、干旱、炎热的环境条件下都能生存,并在高度的盐渍化土壤中能生长。成片天然胡杨林的存在,对改善当地气候、阻挡风沙侵袭具有积极作用。胡杨通过发达的根系从土壤中吸收盐分,增强细胞的渗透压,提高吸收土

壤中水分的效率^[39]。胡杨能适应干旱高温环境的关键要素是其茎秆液^[3]。胡杨茎秆液是胡杨应对高蒸发量的蓄水储备。胡杨树利用发达的根系吸收地下水,通过微管组织输送到树干、树枝及其末端的体内蓄水。胡杨树中的茎秆液量有季节性的变化规律。胡杨茎秆液的累积开始于春季,在夏季其量达到最高从而应对烈日照射下的蒸腾,秋季减少借此减轻负担,冬季消失以防植物躯干冻裂^[40]。这种独特的生理作用显示了胡杨特殊的生存环境。Forchetti 等^[41]研究发现利用从干旱土壤的向日葵根际分离出的细菌处理向日葵种子能够增强向日葵幼苗的耐旱性。国内已有筛选耐旱菌株^[42]、用丛枝菌根真菌提高柑橘耐旱性的相关报道^[43],然而利用内生菌提高植物耐旱性的研究较少。从茎秆液分离得到的菌株 ML-64,作为胡杨内生菌有一定的耐旱、耐盐、耐高温的特性,可为拓宽内生细菌资源的应用范围和利用价值提供一定的科学基础,并且为增强植物耐旱、耐盐、耐高温等特性及改善其品质特性提供新的思路。

参考文献

[1] Ayoupu M, Chen Y. Xylem hydraulic traits of *Populus euphratica* Oliv. in extremely drought environment. *Acta Ecologica Sinica*, 2012, 32 (9): 2748-2758. (in Chinese)
木巴热克·阿尤普, 陈亚宁, 郝兴明, 李卫红, 苏芮. 极端干旱环境下的胡杨木质部水力特征. *生态学报*, 2012, 32(9): 2748-2758.

[2] Han L, Wang HZ, Zhou ZL, Li ZJ. Population structure and demography of *Populus euphratica* in upper and middle reaches of Tarmi River. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(4): 1316-1322. (in Chinese)
韩路, 王海珍, 周正立, 李志军. 塔里木河上、中游胡杨种群结构与统计分析. *生态学报*, 2007, 27(4): 1316-1322.

[3] Yusuf K, Pulat S, Turdahun M, Hamdun M, Osman G, Abdurehim Z, Rahman E. Phylogenetic diversity of culturable endophytic bacteria isolated from the *Populus euphratica* at the disused ancient Ugan River. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (2): 178-188. (in Chinese)
卡依尔·玉素甫, 谢仁阿依·甫拉提, 玛丽帕·吐达洪, 马

丽艳木·阿木东, 艾尼江·尔斯曼, 祖母拉提·阿布都热依木, 艾尔肯·热合曼. Ugen 古河道可培养内生细菌的多样性. *微生物学报*, 2011, 51 (2): 178-188.

- [4] Su LT, Song YD, Zhang ZY. Study on the spatio-temporal variation of groundwater salt content in Xinjiang Weigan Catchment. *Acta Geographica Sinica*, 2003, 58 (6): 854-860. (in Chinese)
苏里坦, 宋郁东, 张展羽. 新疆渭干河流域地下水含盐量的时空变异特征. *地理学报*, 2003, 58 (6): 854-860.
- [5] 玛丽帕·吐达洪. Kiyik 河上游土壤可培养细菌多样性分析以及一株新种的分类学鉴定. 新疆大学硕士学位论文, 2011.
- [6] Shi JY, Chen WX, Liu AY. Advances in the study of endophytes and their effects on control of plant diseases. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26 (7): 2395-2401. (in Chinese)
石晶盈, 陈维信, 刘媛媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展. *生态学报*, 2006, 26(7): 2395-2401.
- [7] Jiang S, Cheb DJ, Tao JH, Ge M. Advances of pharmaceutical research on plant endophytes and their metabolites. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2008, 29(6): 424-426. (in Chinese)
江曙, 陈代杰, 陶金华, 戈梅. 植物内生菌及其代谢产物的药学研究进展. *中国生化药物杂志*, 2008, 29(6): 424-426.
- [8] Wen CY, Wu YH, Tian XL. Recent advances and issues on the endophyte. *Chinese Journal of Ecology*, 2004, 23 (2): 86-91. (in Chinese)
文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题. *生态学杂志*, 2004, 23 (2): 86-91.
- [9] Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(5): 1117-1125.
- [10] Miwa H, Ahmed I, Yokota A, Fujiwara T. *Lysinibacillus parviboronicapiens* sp. nov., a low-boron-containing bacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(6): 1427-1432.
- [11] Lee CS, Jung YT, Park S, Oh TK, Yoon JH. *Lysinibacillus xylanilyticus* sp. nov., a xylan-degrading

- bacterium isolated from forest humus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60 (2) : 281-286.
- [12] Jung MY, Kim JS, Paek WK, Styrak I, Park IS, Sin Y, Paek J, Park KA, Kim H, Kim HL, Chang YH. Description of *Lysinibacillus sinduriensis* sp. nov., and transfer of *Bacillus massiliensis* and *Bacillus odysseyi* to the genus *Lysinibacillus* as *Lysinibacillus massiliensis* comb. nov. and *Lysinibacillus odysseyi* comb. nov. with emended description of the genus *Lysinibacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62 (10) : 2347-2355.
- [13] Coorevits A, Dinsdale AE, Heyrman J, Schumann P, Van Landschoot A, Logan NA, De Vos P. *Lysinibacillus macroides* sp. nov., nom. rev.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62 (5) : 1121-1127.
- [14] Yang LL, Huang Y, Liu J, Ma L, Mo MH, Li WJ, Yang FX. *Lysinibacillus mangiferahumi* sp. nov., a new bacterium producing nematocidal volatiles. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2012, 102 (1) :53-59.
- [15] Seiler H, Scherer S, Wenning M. *Lysinibacillus meyeri* sp. nov., isolated from a medical practice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63 (4) :1512-1518.
- [16] K Ämpfer P, Martin K, Glaeser SP. *Lysinibacillus contaminans* sp. nov., isolated from surface water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63 (9) : 3148-3153.
- [17] Kim SJ, Jang YH, Hamada M, Ahn JH, Weon HY, Suzuki K, Whang KS, Kwon SW. *Lysinibacillus chungkukjangi* sp. nov., isolated from chungkukjang, Korean fermented soybean food. *Journal of Microbiology*, 2013, 51 (3) :400-404.
- [18] Liu H, Song Y, Chen F, Zheng S, Wang G. *Lysinibacillus manganicus* sp. nov., isolated from manganese mining soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63 (10) : 3568-3573.
- [19] Ahmed I, Sin Y, Paek J, Ehsan M, Hayat R, Iqbal M, Hyo Y. Description of *Lysinibacillus pakistanensis*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2014, 16 (2) :445-450.
- [20] Duan YQ, He ST, Li QQ, Wang MF, Wang WY, Zhe W, Cao YH, Mo MH, Zhai YL, Li WJ. *Lysinibacillus tabacifolii* sp. nov., a novel endophytic bacterium isolated from *Nicotiana tabacum* leaves. *Journal of Microbiology*, 2013, 51 (3) :289-294.
- [21] Li T, Ren Y, Wei CH. Preparation of PVA-SA-PHB-AC composite carrier and m-cresol biodegradation by immobilized *Lysinibacillus cresolivorans*. *Environmental Science*, 2013,34 (7) : 2899-2905. (in Chinese)
李婷,任源,韦朝海. 固定化 *Lysinibacillus cresolivorans* 的 PVA-SA-PHB-AC 复合载体制备及间甲酚的降解. *环境科学*,2013,34 (7) :2899-2905.
- [22] Ji YR, Xu XH, Yang QL, Gao Y, Liu YF, Dong Y, Shi J, Liu Y, Guang J. Studies on isolation and degrading characteristics of sulphide-degrading bacteria and its mutagenic bacteria. *Heilongjiang Science*,2013,4 (6) :34-36. (in Chinese).
姬妍茹,许修宏,杨庆丽,高媛,刘宇峰,董艳,石杰,刘玉. 关向军脱硫细菌的筛选及其对硫化钠降解性能的研究. *黑龙江科学*,2013,4 (6) :34-36.
- [23] Smibert RM, Krieg NR. Phenotypic characterization. In methods for general and molecular bacteriology. *American Society For Microbiology*, 1994, 32: 607-654.
- [24] Cowan ST, Steel KJ. Manual for the identification of medical bacteria. London: Cambridge University Press, 1965.
- [25] Lanyi, B. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria. *Methods Microbiology*, 1987, 19 (1) : 1-67.
- [26] James AT, Martin AJ. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. *National Institute for Medical Research*, 1952, 50 (5) : 679-690.
- [27] Moreira C, Rainey FA, Nobre MF, da Silva MT, da Costa MS. *Tepidimonas ignava* gen. nov., sp. nov., a new chemolithoheterotrophic and slightly thermophilic member of the β -Proteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50 (2) : 735-742.
- [28] Collins MD, Pirouz T, Goodfrilow M, Minnikin DE. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *Journal of General Microbiology*, 1977, 100 (2) : 221-230.
- [29] Tindall BJ. Respiratory lipoquinones as biomarkers. // Kowalchuk GA, de Bruijn FJ, Head IM, Van der Zijpp

- AJ, van Elsas JD (Eds.). *Molecular microbial ecology manual*. 2nd ed. Holland Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2004, 2 volumes (Section 4): 2907-2928.
- [30] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry Physiology*, 1959, 37(8): 911-917.
- [31] Liu G, Zhai CY. A current and speedy extraction method for bacterial chromosomal DNA from a trifle of broth. *Medical Journal of West China*, 2004, 6(16): 111-113. (in Chinese)
刘刚, 翟朝阳. 一种通用的从少量培养液中快速提取细菌染色体 DNA 的方法. *西部医学*, 2004, 6(16): 111-113.
- [32] Huo YY, Xu XW, Wang CS, Yang JY, Wu M. Bacterial diversity of the sediment from Cang nan Large Fishing Bay. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28(10): 5166-5172.
- [33] Thompson JD, Gibson TJ, Plewni F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 24(4): 876-888.
- [34] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular evolution*, 1980, 16(2): 111-120.
- [35] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [36] DeLey J, Cattoir H, Reynaerts A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *European Journal of Biochemistry*, 1970, 12(1): 133-142.
- [37] Mannur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology*, 1962, 5:109-118.
- [38] Mamtimin H, Yusuf K, Erkin R, Hamood B, Ismayil N, Rozahon M, Abdurahman M, Ma Xangru, Rahman E. Study on temporal and spatial patterns of culturable endophytic bacteria diversity and community structure of *Populus euphratica* at Tarim Rivers. *Acta Ecologica Sinica*, 2014, 34(22): 6622-6639. (in Chinese)
吾尔麦提汗·麦麦提明, 卡依尔·玉素甫, 热孜亚·艾肯, 布阿依夏姆·阿木提, 努丽曼姑·司马义, 买孜拉木·肉扎洪, 麦合甫再木·阿布都热合曼, 马相汝, 艾尔肯·热合曼. 塔里木胡杨林可培养胡杨内生细菌多样性与群落结构的时空演变格局研究. *生态学报*, 2014, 34(22): 6622-6639.
- [39] 刘晏良. 塔里木河中下游实地踏勘报告. 北京: 中国统计出版社, 2000:164-167.
- [40] Rozahon M, Ismayil N, Hamood B, Erkin R, Abdurahman M, Mamtimin H, Abdurkerim M, Lal R, Rahman E. *Rhizobium populi* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from *Populus euphratica*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(9): 3215-3221.
- [41] Forchetti G, Masciarelli O, Izaguirre M, Izaguirre MJ, Alemano S, Alvarez D, Abdala G. Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi. *Current Microbiology*, 2010, 61(6): 485-493.
- [42] Zhang YT, Sheng JP, Ge J, Jiao YC, Wang ZR, Cheng FS, Shen L. Isolation and identification of bacteria from Xerophytes. *Food Science*, 2012, 33(5): 124-128. (in Chinese)
张彦涛, 生吉萍, 葛佳, 矫玉翠, 王正荣, 程凡升, 申琳. 旱生植物内生细菌的分离及耐旱菌株的筛选鉴定. *食品科学*, 2012, 33(5): 124-128.
- [43] 吴强盛. 丛枝菌根真菌对柑橘抗旱性的作用及其机理研究. 华中农业大学博士学位论文, 2006.

Microbiological characteristics of a *Lysinibacillus* strain isolated from *Populus euphratica*

Nusratgul Anwar, Raziya Erkin, Hormathan Mamtimin, Buayshem Hamood, Nurimangul Ismayi, Muhtar Abdukerim, Erkin Rahman*

College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to identify the microbiological characteristics of a *Lysinibacillus* strain isolated from storage liquid in the stems of *Populus euphratica* trees. [Methods] Bacterial morphology and cultivation characteristics were studied by conventional cultivation and dyeing method. Biochemical characteristics, fatty acid components, menaquinone, polar lipids, phylogenetic analyses of 16S rRNA, determination of (G + C) mol% content and DNA–DNA hybridization were studied by polyphasic taxonomic approach. [Results] Strain ML-64 is Gram-positive, endospore-forming and rod-shaped. Colonies are pale-yellow, circular and entire margin. Temperature range for growth is between 10 and 45 °C (optimum at 37 °C). The pH range for growth is between 6.0 and 9.0 (optimum at 7.0). NaCl concentration range for growth is between 0 and 6% (optimum 3%). Cells were positive for lipid esterase, Arginine dihydrolase, urease and Voges–Proskauer test. No sugars were fermented in the API 50CH strips. L-Serine, Methyl Pyruvate, α -Keto-Butyric, Acetoacetic Acid were oxidized. Resistant to polymyxin b (30 μ g), novobiocin (30 μ g), peillin G (10 U). 16S rRNA gene sequence demonstrated that strain ML-64 was closely related to *Lysinibacillus chungkukjangi* 2RL3-2T (100%), *Lysinibacillus sinduriensis* BLB-1T (99.1%). DNA–DNA relatedness were 82% and 50.9% with *Lysinibacillus chungkukjangi* 2RL3-2T and *Lysinibacillus massiliensis* CIP108446T, respectively. The genomic DNA G + C content of strain ML-64 was 36.8% (mol). Major fatty acids were iso-C_{15:0} (55.05%) and anteiso-C_{15:0} (20.70%). The predominant menaquinone is MK-7. Based on the phenotypic phylogenetic and genotypic analyses, the strain ML-64 is concluded to represent a new mutant strain of the *Lysinibacillus chungkukjangi* species, GenBank accession number is KC609752. [Conclusion] As an endophytic bacterium of *Populus euphratica*, genomic structure of the strain ML-64 was greatly differentiated from the closest strain *L. chungkukjangi*, and suitably adapted to the endophytic environment of *Populus euphratica*.

Keywords: genus *Lysinibacillus*, endophytic bacterium of *Populus euphratica*, polyphasic taxonomic approach

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31060002, U1203101) and by Xinjiang Uygur Autonomous Region Science and Technology Support Project (201091236)

* Corresponding author. Tel: +86-991-8583450; E-mail: erkin1106@163.com

Received: 19 November 2014/Revised: 15 March 2015