

菌株 F12-11-1-2 的 16S rDNA 序列分析及其生理生化性质研究*

刘小宇 许强芝 杨 妍 艾 峰 焦炳华**

(第二军医大学基础部生化教研室 上海 200433)

摘要: 菌株 F12-11-1-2 是一株从中国东海浙江海域 200m 的海泥中分离得到的, 具有抗稻瘟霉 (*Pyricularia oryzae*) 活性。通过对菌株的形态、培养特征、生理生化特征的研究以及 16S rDNA 序列分析, 结果表明它是一株适应了海洋环境的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

关键词: 海洋细菌, 16S rDNA, 鉴定

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-0654 (2007) 01-0036-03

The 16S rDNA Sequence Analysis and Phenotypical Study of Strain F12-11-1-2*

LIU Xiao-Yu XU Qiang-Zhi YANG Yu AI Feng JIAO Bing-Hua**

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Secondary Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract: The strain F12-11-1-2 was isolated from the East China Sea, which had antimotility activity using *Pyricularia oryzae* mode. According to phenotypical study, salt-aggregation test and 16S rDNA sequence analysis, the strain F12-11-1-2 has been identified to be *Bacillus subtilis*.

Key words: Marine microorganisms, 16S rDNA, Identification

由于从陆地微生物中寻找新的生物活性物质已愈来愈困难, 种类正在减少, 找到的往往经鉴定是已知的化合物, 这迫使人们要开辟资源的新来源。海洋面积占地球的 70%, 是今后人类重要的资源开发的宝库。本课题组在中国东海的各种微生物样品分离筛选过程中, 得到的一株具有抗稻瘟霉 (*Pyricularia oryzae*) 活性的菌株 F12-11-1-2。本文通过菌株形态、培养和生理生化特性并结合 16S rDNA 序列分析对该菌进行了分类鉴定。

1 材料与方法

1.1 样品来源

F12-11-1-2 分离自东海海泥样品, 菌株由本实验室保存。稻瘟霉 (*Pyricularia oryzae*) P-2b, 复旦大学医学院提供。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 形态特征: 于 ZoBell 2216E 培养基 (人工海水配置) 上 28℃ 培养 2 d, 取菌体涂片, 革兰氏

染色后用光学显微镜观察菌体形态, 改良的 Schaeffer-Fulton 氏染色观察芽孢。

1.2.2 培养特征: 在 ZoBell 2216E 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、LB 培养基上 28℃ 培养 2~3 d 后观察菌落形态及颜色。

1.2.3 生理生化特征: 参考《微生物学实验手册》^[1] 进行生理生化实验及不同盐度生长实验。

1.2.4 16S rDNA 序列测定和分析: 参考邹玉霞等的方法^[2] 将菌株 F12-11-1-2 接种在无菌的平板上, 28℃ 培养过夜, 取单菌落悬浮于 50 μL 无菌蒸馏水中, 于 100℃ 水浴 5 min, 离心, 取上清作为细菌 DNA 原液。采用通用引物进行 16S rDNA 基因的 PCR 扩增, PCR 产物纯化后委托测序公司进行序列测定。

2 结果与讨论

2.1 菌株的形态特征和培养特征

菌株形态特征和培养特征如表 1 所示, 从表

* 上海市优秀学科带头人计划资助项目 (No. 2005XD14023)

** 通讯作者 E-mail: jiaobh@uninet.com.cn

收稿日期: 2006-03-09, 修回日期: 2006-06-12

中可以看出 F12-11-1-2 革兰氏染色阳性，芽孢中 生，因此 F12-11-1-2 应属于芽孢杆菌科。

表 1 菌株 F12-11-1-2 形态特征和培养特征

芽孢			菌落							菌体	
形状	位置	膨大与否	形状	大小	表面	突起	透明度	边缘	颜色	革兰氏染色	形状
卵圆	居中	—	圆形	1mm~2mm	光滑	隆起	—	整齐	微黄	+	杆状

2.2 生理生化特征

菌株部分生理生化特征如表 2 所示，从表中可以看出，F12-11-1-2 能水解淀粉和明胶，不能水解油脂，V.P 反应阳性，石蕊牛奶不产酸，pH5.7 培养基上生长，不能利用丙酸盐。

在不同 NaCl 浓度下菌株 F121112 的生长情况结果见图 1 所示。

表 2 菌株 F12-11-1-2 部分生理生化特征

生理生化特性	菌株 F12-11-1-2
运动性	+
淀粉水解	+
油脂水解	-
明胶水解	+
石蕊牛奶	-
V.P 反应	阳性
过氧化氢酶	+
卵磷脂酶	-
丙酸盐利用	-
pH5.7	生长

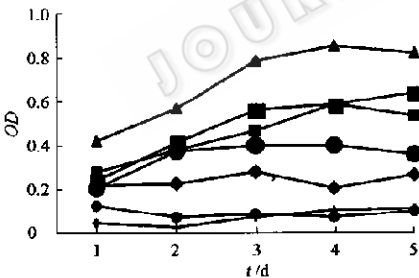


图 1 不同 NaCl 浓度下对菌株 F121112 生长的影响

—●— 0, —■— 0.25%, —▲— 2.5%, —■— 5%,
—●— 7.5%, —●— 10.0%, —+— 12.5%

由图 1 可知，在 0.25% ~ 7.5% 的盐度下，F121112 菌株长势良好，其中最适盐度为 2.5%。在低盐度下菌株也能生长，但菌体密度明显较低。在较高盐度下菌体生长情况不佳。说明该菌株是一株弱嗜盐菌。

2.3 16S rDNA 序列分析

菌株 F12-11-1-2 的 16S rDNA 序列分析结果如

下：

CCTATAATGCAAGTCGAGCGGAAGATGGGAGCCTT
GCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGACTAAC
ACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT
CCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGTTGTTT
GAACCCGATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCG
GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAG
CTAGTTGCTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACG
ATGCCTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCGAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGCACG
AAAGCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATG
AAGGTTTTGCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTCCGCTTCAAATAGGCGCGCACCTT
GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA
CGTGCCAGCAGCCCGCGTAATACGTAGCTGCCA
AGCGTTGTCGGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTC
GCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC
CGGCTCAACCCGCGGACGGCTCATTGGAACTGGG
GAACCTGACTGCACAAGACGAGACTGGAATTCC
ACGTGTAGCGCTGAAATGCGTAGAGATGTGGAG
CAACACCACTGCGGAAGGCGACTCTCTGCTCTGT
AACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCCTGGGGAGCG
AACAGGATTAGATACCCTGCTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTCTTAGGGGGTTTCCGCC
CCTTAGTGCTGCAGCTAAGCATTAAAGCACTCCG
CCTGGGAGTACGGTCGAAAGACTGAACTCAA
AGGAATTGACGGCGGCGGCGACAAGCGCTGCAG
CATGTGGTTTAATTGCAAGCAACCGGAAGAACCT
TACCAGGCTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAG
ATAGGACGTCCCTTCGGGGGCGAGACTGACAGCT
GCTGCATGGTTGCTCCTCAGCTCCTGCTCGTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTG
ATCTTAGTTCGGAGCATTACAGTTGGGCACTCTAA
GGTGACTGCCGCTCACAAACCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT

GGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAA
GGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAAATCCCA
CAAATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCGCAA
CTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCCGCGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT
TGTAACACCCGAAGTCGGTCAGGTAACCTTTTAG

GAGCCAGCCGCCGAAGCTGGGACAGATGATTGG
GGGAAGTCGAA

所测定得到的 16S rDNA 序列结果经校正后输入 Genank 用 Blast 软件进行相似性搜索比较, Clustal W1.8 软件进行多序列比对, 从比对处的高度同源序列中随机选取部分序列构建了系统进化树, 如图 2 所示。

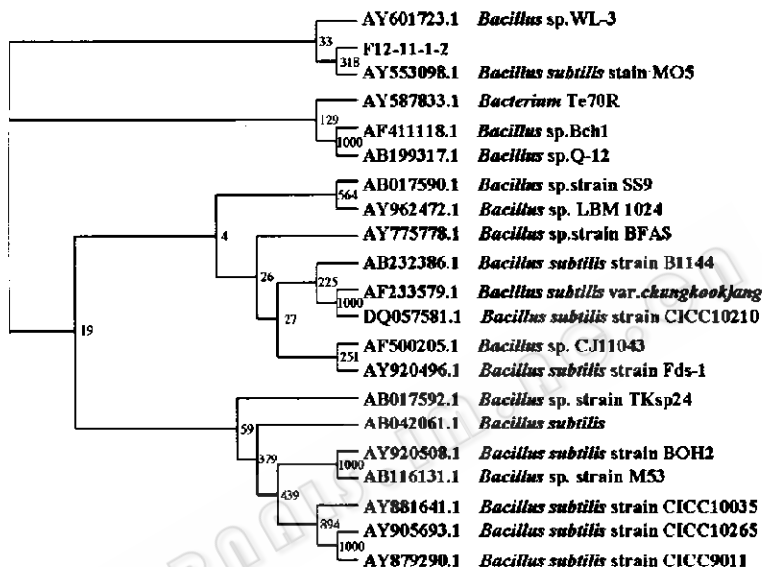


图2 菌株 F12-11-1-2 的系统发育树

根据比对结果, 发现 F12-11-2 与 *Bacillus subtilis* strain MO5 在进化位置上最为接近。根据菌株形态特征、培养特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列分析结果, 将 F12-11-1-2 定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

参考文献

- [1] 周德庆主编. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [2] 邹玉露, 张路军, 莫照兰, 等. 高技术通讯, 2004, 4.

• 稿件规范化与标准化 •

阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字, 年份必须用全称。对科技期刊来说, 凡处在计量单位和计数单位前面的数字, 包括 9 以下的各位数字, 除个别特例外, 均应用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字, 例如: 一本教材, 两种商品等。4 位以上 (含 4 位) 的数字, 采用三位分节法, 节和节之间空开 1/4 格的间距。