微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn
http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

Mar. 20, 2020, 47(3): 727−737
DOI: 10.13344/j.microbiol.china.190534

研究报告

固氮菌 *Klebsiella variicola* GN02 基因序列及其分泌胞外多糖的相关特性

林标声[1,2,3] 陈小红[1] 何玉琴[1] 罗茂春[*1,2]

1 龙岩学院生命科学学院 福建 龙岩 364012
2 预防兽医学与生物技术福建省高等学校重点实验室 福建 龙岩 364012
3 福建农林大学生命科学学院 福建 福州 350002

摘 要:【背景】一些固氮菌能分泌胞外多糖，与宿主植物的关系密切，在提供氮素和促进植物生长有重要作用。【目的】进行固氮菌 *Klebsiella variicola* GN02 的基因序列分析，了解分泌胞外多糖的相关基因和其蛋白的结构特性。【方法】用二代和三代测序技术相结合的方法对 GN02 菌株进行全基因组分析，并对其分泌的胞外多糖进行理化、结构特性解析。【结果】GN02 菌株基因组中含有许多与氮代谢及多糖合成、分泌相关的基因及蛋白，该菌株培养后提取的胞外多糖得率为 6.90 g/L、分子量 1.8×10^3 Da、比旋度$[\alpha]_D^{25}$ 75°、粘度$[\eta]$ 80.28；多糖组成为葡萄糖、半乳糖和甘露糖，为(1→3)及(1→6)糖苷键连接的β构型多糖，具有多糖的红外光谱特征吸收峰。【结论】提供了 *K. variicola* GN02 菌株基因组序列，解析了分泌胞外多糖的基因相关蛋白、理化性质及结构特性，有助于进一步了解该固氮菌分泌多糖的机理及为植物促生作用的相关性研究提供基础。

关键词: 固氮菌，*Klebsiella variicola*，基因序列，胞外多糖，蛋白，结构特性

Gene sequence of nitrogen-fixing bacteria *Klebsiella variicola* GN02 and its association with exopolysaccharide secretion

LIN Biao-Sheng[1,2,3] CHEN Xiao-Hong[1] HE Yu-Qin[1] LUO Mao-Chun[*1,2]

1 College of Life Sciences, Longyan University, Longyan, Fujian 364012, China
2 Key Laboratory of Fujian University Preventive Veterinary Medicine and Biotechnology, Longyan, Fujian 364012, China
3 College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract: [Background] Some nitrogen-fixing bacteria can secrete exopolysaccharide, which was closely related to the host plants, and plays an important role in providing nitrogen and promoting the growth of plants. **[Objective]** To analyze the gene sequence of nitrogen-fixing bacteria *Klebsiella variicola* GN02, and the structural characteristics of the genes and proteins relating to the secretion of extracellular

Foundation items: Special Fund in Fujian Province for the Development of Science and Technology under the Guidance of the Central Committee (2018L3003); Student Innovation and Entrepreneurship Training Program of Fujian Province (201811312007)
***Corresponding author:** E-mail: fjlylmc@163.com
Received: 28-06-2019; **Accepted:** 23-09-2019; **Published online:** 04-11-2019
基金项目：中央引导地方科技发展专项资金(2018L3003)；福建省大学生创新创业训练计划(201811312007)
*通信作者：E-mail：fjlylmc@163.com
收稿日期：2019-06-28；接受日期：2019-09-23；网络首发日期：2019-11-04

polysaccharides were investigated. **[Methods]** The whole genome of GN02 strain was analyzed by the combination of the second and third-generation sequencing techniques, and the physicochemical and structural characteristics of its secreted extracellular polysaccharides were also analyzed. **[Results]** The genome of GN02 strain contains many genes and proteins relating to nitrogen metabolism and polysaccharide synthesis and secretion. The yield of exopolysaccharide extracted by GN02 strain was 6.90 g/L, molecular weight was 1.8×10^3 Da, specific rotation $[\alpha]_D^{25}$ 75° and the viscosity [η] was 80.28. The polysaccharides consist of glucose, galactose and mannose, which were β-configuration polysaccharides linked by (1→3) and (1→6) glycoside bonds, and had the characteristic absorption peak in infrared spectrum. **[Conclusion]** The genomic sequence of *K. variicola* GN02 strain was provided, and the gene-relating proteins, physicochemical properties and structural properties of extracellular polysaccharides were analyzed, which helped to further understand the mechanism of exopolysaccharides secreted by nitrogen-fixing bacteria and to provide the basis for the correlation research of plant growth promoting effect.

Keywords: Nitrogen-fixing bacteria, *Klebsiella variicola*, Gene sequence, Exopolysaccharide, Protein, Structural characteristic

植物内生固氮菌(endophytic diazotroph)是指能在健康植物体内定殖，并与宿主植物行联合固氮的一类微生物[1-2]，*Klebsiella variicola* GN02 菌株为本实验室从禾本科植物巨菌草(*Pennisetum giganteum* z.x.lin)成熟期根部中分离得到的一株具有较高固氮酶活性和良好促生性能的内生固氮菌，属于克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)细菌；实验室前期小鼠经口毒性和大鼠经皮毒性试验证明[3]，该菌株安全、无毒、不是临床上流行肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)已有分型的强毒力菌株，可在农业上使用。多年的研究表明，*K. variicola* 是一种常见的与植物联合的固氮菌，普遍分布于甘蔗、玉米、水稻等禾本科植物的根部及土壤中，其与植物在长期进化和系统发育过程中建立了一种联合的关系，是一种丰富的联合固氮微生物资源[4-5]。虽然克雷伯氏菌属的几种菌株是重要的条件致病菌和医源性感染菌，但在农业微生物和工业污染治理等方面的研究表明，克雷伯氏菌对植物本身不表现致病性，而且还是一种绿色菌肥和高效净化剂[6-7]。植物内生固氮菌在植物联合固氮体系中发挥了重要的作用，研究表明一些内生固氮菌不仅能分泌氮相关化合物(如铵态氮)为植物生长提供充足的氮素，还能分泌出一些胞外多糖参与了植物促生过程的调控[8]；但一直以来人们更多关注的是这些内生固氮菌主要固氮相关基因 *nif*H 的表达[9-10]、泌氨量多少等[11]，对其所分泌的胞外多糖特性、相关基因及表达蛋白的研究较少。克雷伯氏菌属细菌的胞外多糖中包含荚膜多糖和分泌到细胞外的粘液多糖[12-13]，这些胞外多糖对于细菌养分集聚、提高抗逆性、趋化性和表面粘附等均具有良好的促进作用。在植物促生长方面，微生物胞外多糖可通过影响土壤物理、化学和生物学性质从而实现提高宿主植物钾肥的利用效率[14]；胞外多糖还具有粘合作用，胞外多糖在土壤环境中可将菌体与土壤颗粒或其它物质粘接起来，有利于协调作物生长的微环境[15]；此外，胞外多糖还能充当微生物菌株与宿主植物之间信号分子识别的桥梁作用[16]。克雷伯氏菌属细菌虽然在医学临床上属于致病菌，但研究表明，克雷伯氏菌属细菌的胞外多糖对人体却是安全的，1988 年 Cross 等就报道了可用克雷伯氏菌特异性荚膜多糖制备人类疫苗[17]。

因此，本文以 *K. variicola* GN02 菌株为材料，运用基于 Illumina MiSeq 测序平台的第二代测序技术和基于 PacBioRS II 测序平台的第三代单分子测序技术相结合的方法对其进行全基因组测序分析和注释，寻找 *K. variicola* GN02 菌株中与多糖合成、分泌相关的基因及蛋白，并对其所分泌的胞外多糖进行理化性质、结构特性分析，对固氮菌

胞外多糖的特性进行深入分析，以期能为进一步深入探究克雷伯氏菌属固氮菌胞外多糖与宿主植物的相关性研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

K. variicola GN02，本实验室从巨菌草成熟期根部分离，经本实验室对其进行菌落形态、16S rRNA 基因测序和促生性能鉴定后在中国(北京)普通微生物菌种保藏管理中心保藏(编号：CGMCC 1.13619)。

1.2 培养基

Ashby 无氮培养基(g/L)：甘露醇 10.0，KH_2PO_4 0.2，$MgSO_4·7H_2O$ 0.2，NaCl 0.2，$CaSO_4·2H_2O$ 0.1，$CaCO_3$ 5.0，琼脂 20.0，pH 7.0−7.2。

糖发酵培养基(g/L)：葡萄糖 10.0，酵母浸粉 0.2，$MgSO_4·7H_2O$ 0.2，$(NH_4)_2HPO_4$ 1.0，KCl 0.2，0.04%溴甲酚紫 15 mL，pH 7.0−7.2。

1.3 主要试剂和仪器

溴化十六烷基三甲铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide，CTAB)，北京索莱宝科技有限公司；DNA marker、聚合酶等，宝生物工程(大连)有限公司；引物合成，上海派森诺生物科技股份有限公司。

PCR 仪、测序仪，Applied Biosystems 公司；红外光谱仪，岛津(中国)有限公司；紫外光谱仪，尤尼柯(上海)仪器有限公司；全自动旋光仪，上海佳航仪器仪表有限公司；数字式粘度计，上海平轩科学仪器有限公司。

1.4 *K. variicola* GN02 全基因组测序

将 GN02 菌株经 Ashby 无氮培养基活化、30 °C、180–200 r/min 培养 24 h 后，4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体，经 PBS 缓冲溶液(pH 7.2)清洗 3 次后备用。采用 CTAB 法提取细菌基因组总 DNA，以满足全基因组测序 DNA 量，提取方法参照杨琦玥等[18]的方法进行。引物为 F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 R(5′-CTACGGCTACCTTGTTAC GA-3′)。PCR 反应体系(25 μL)：基因组 DNA (5 ng/μL) 1.0 μL，5×Q5 反应缓冲液 5.0 μL，Q5 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL，5×Q5 High GC Enhance 5.0 μL，dNTPs (10 mmol/L) 2.0 mL，引物 F (10 μmol/L) 1.5 μL，引物 R (10 μmol/L) 1.5 μL，ddH_2O 8.75 μL。PCR 反应条件：98 °C 3 min；98 °C 30 s，56 °C 30 s，72 °C 90 s，24 个循环；72 °C 5 min。GN02 菌株全基因组测序采用了 WGS (whole genome shotgun)策略，首先构建出具有不同插入片段的文库，再运用基于 Illumina MiSeq 测序平台的第二代测序技术和基于 PacBioRS II 测序平台的第三代单分子测序技术相结合的方法对其进行全基因测序分析。测序工作由上海派森诺生物科技股份有限公司完成。对所获得的高通量测序数据采用 SPAdes genome assembler V3.11.1 软件对经过 Kmer 校正的数据进行拼接、组装，构建 GN02 菌株全基因组信息，进行基因组分析和功能注释。具体参照 Liu 等[19]的方法进行，寻找 *K.* GN02 菌株中与多糖合成、分泌相关的基因及蛋白。

1.5 *K.* GN02 菌株胞外多糖提取及理化性质、结构的解析

1.5.1 胞外多糖的提取

将 GN02 菌株在 Ashby 无氮培养基上活化后，取对数生长期的菌液按 1%接种量接种到糖发酵培养基中进行摇床培养产糖，30 °C、180 r/min 培养 48 h。培养结束后，4 000 r/min 离心 10 min 取菌液 100 mL，随后浓缩至 30 mL 左右，加 3 倍体积 95%乙醇沉淀多糖，4 °C 冰箱静置过夜、4 000 r/min 离心 15 min，收藏沉淀，依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤后进行低温干燥。对低温干燥的 GN02 菌株分泌的胞外多糖称重，计量多糖提取率。

1.5.2 胞外多糖的理化性质鉴定

观察所提取胞外多糖的形状、颜色、气味等；取多糖样品溶解于水、乙醇、乙醚、丙酮等有机溶剂中，分析其溶解性能；将提取的多糖分别进行 $AgNO_3$、茚三酮反应、碘—碘化钾、硫酸甲萘酚、硫酸蒽酮溶液反应，判定其多糖的反应特性。

配制 0.167 mg/mL 的多糖水溶液，采用紫外光谱仪对配制的多糖溶液进行紫外光谱分析，扫描

范围 200−400 nm，检测提取多糖的纯度。

配置 10 mg/mL 多糖溶液，经 SephadesG-200 层析柱层析，与已知分子量多糖标准品洗脱体积比较计算所提取的 GN02 菌株多糖分子量。

配置 1% GN02 胞外多糖溶液，采用自动指示旋光仪和数字黏度计测定该多糖溶液的比旋度和特性黏度。其中，比旋度的计算公式：

$[\alpha]=\alpha/(C\times L)$

其中：α 表示溶液测得的旋光度，C 表示溶液的浓度(单位：g/100 mL)，L 表示测定管长度(dm)，20 cm 的样品管。

1.5.3 胞外多糖的结构鉴定

多糖的组分采用薄层层析法[20]；糖苷键分析采用高碘酸氧化法及 Smith 降解法[21]；多糖结构的解析采用红外光谱仪扫描[22]。

2 结果与分析

2.1 *K. variicola* GN02 菌株测序基本信息

GN02 菌株经 Illumina MiSeq 测序平台二代、PacBioRS II 测序平台三代测序，去除冗余序列后，拼接的序列总长度为 5 599 366 bp，(G+C)mol%含量为 57.41%；共有开放阅读框(open reading frame，ORF)数 5 261 个，ORF 总长度 4 867 812 bp，(G+C)mol%含量 58.70%；蛋白质编码基因功能注释：在不同的数据库比对，NR 数据库有 5 173 条蛋白编码基因，eggNOG 数据库 4 908 条、KEGG 数据库 3 226 条、Swiss-Prot 数据库 4 491 条、GO 数据库 4 189 条。经上述基因功能注释后，将测序原始数据上传至 NCBI 数据库，获得 NCBI GenBank BioProject ID：CP31061。

将所获得的 GN02 菌株序列信息与 NCBI 上已同样完成基因序列分析的具有固氮作用的 *K. pneumonia* 34 菌株比较(表 1)，两者在基因组大小、(G+C)mol%含量、蛋白编码序列、平均蛋白质编码区(sequence coding for aminoacids in protein，CDS)大小和 RNA 基因数目等方面均较为相似，表明 GN02 菌株具有 *Klebsiella* 属细菌的典型基因组特征。但在 GN02 菌株未发现质粒，表明 GN02 菌株在巨菌草宿主体内，其在进化过程中可能丢失或新获得了一些不同的基因，导致了 GN02 菌株特有的遗传特性[23]。

2.2 *K. variicola* GN02 菌株蛋白质编码基因功能注释分析

eggNOG 分类注释表明，93.29%蛋白编码基因可注释到 eggNOG 上，其中未知功能(function unknown)基因数量最多，高达 1 183 条，占全部编码蛋白基因的 22.49%；在已知功能基因中，碳水化合物转运和代谢(carbohydrate transport and metabolism)数量最多为 490 条，占 9.31%；其次为氨基酸转运和代谢(amino acid transport and metabolism)，460 条，占 8.74% (图 1)。KEGG 注释表明，从代谢通路角度，膜转运(membrane transport)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)和氨基酸代谢(amino acid metabolism)相关的基因丰度最高(图 2)。不同数据库的蛋白基因功能注释均表明，GN02 菌株广泛参与了碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)和氨基酸代谢(amino acid metabolism)。

表 1 2 株 *Klebsiella* 菌属细菌的基本基因组特性

Table 1 General features of genomes of 2 *Klebsiella* strains

项目 Item	GN02	*K. pneumoniae* 34
来源 Source	巨菌草 *Pennisetum giganteum* z.x.lin	玉米 Corn
质粒数量 Number of plasmid	0	2
基因组大小 Genome size (Mb)	5.60	5.64
(G+C)mol% content (%)	57.41	57.29
蛋白编码序列 Protein-coding sequences (bp)	5 261	5 425
平均 CDS 大小 Average CDS size (bp)	925.2	962.73
编码区占比 Percent of coding region (%)	86.90	88.2
核糖体 RNA 操纵子数 Number of ribosomal RNA operons	25	25
tRNA 数量 Number of tRNA	87	88

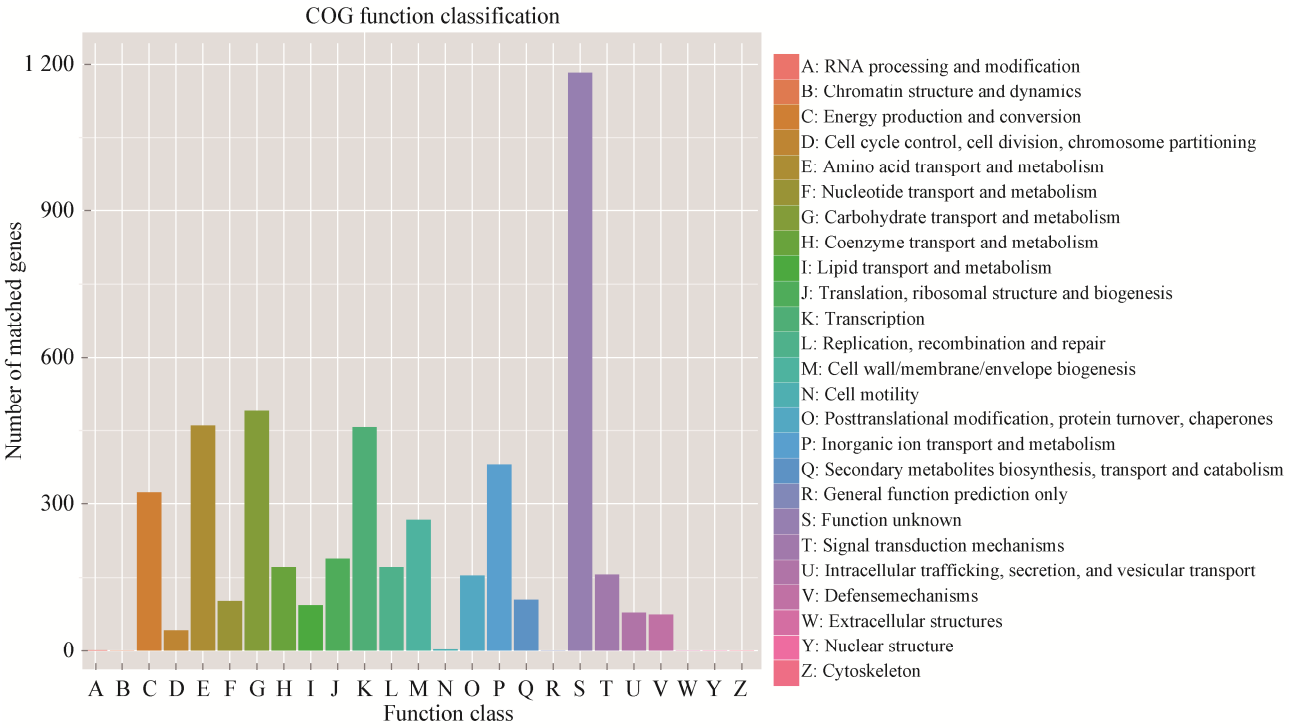

图 1　GN02 菌株的 eggNOG 功能分类

Figure 1　eggNOG functional classification of GN02 strain

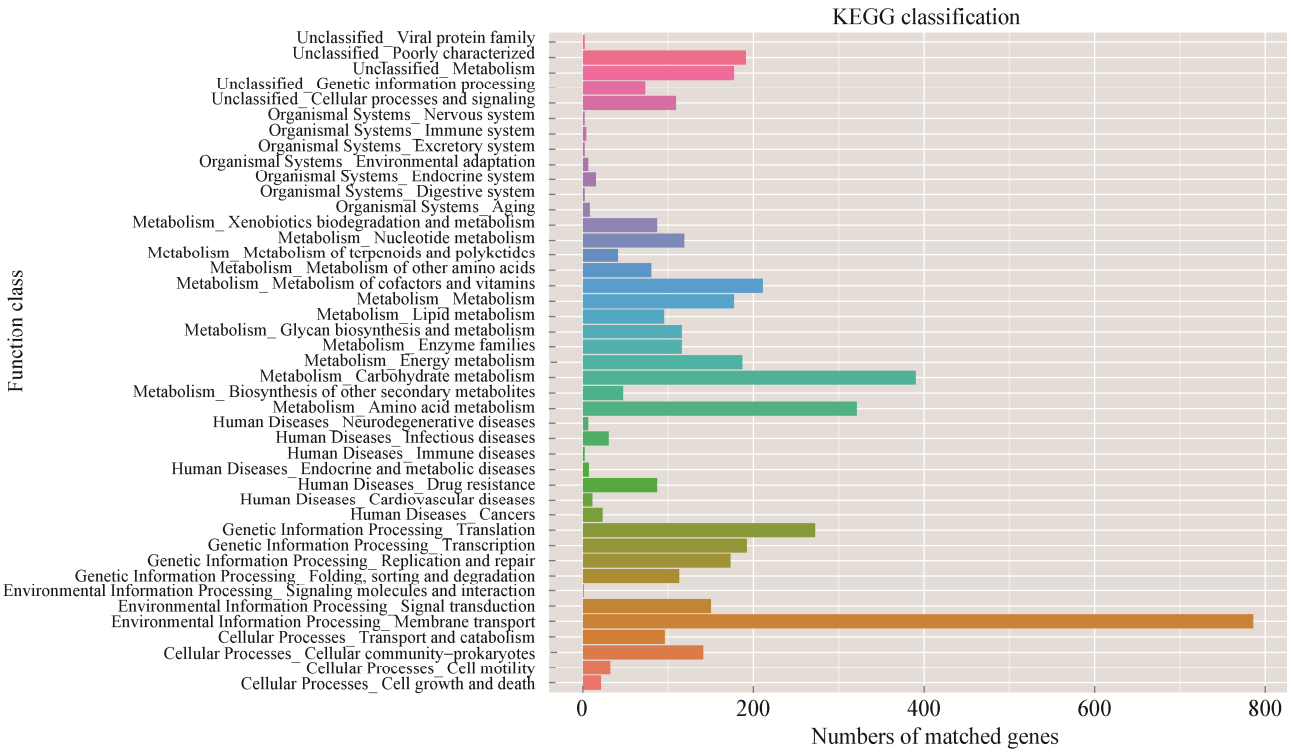

图 2　GN02 菌株的 KEGG 分析统计

Figure 2　KEGG analysis and statistics of GN02 strain

2.3 *K. variicola* GN02 菌株多糖代谢相关蛋白分析

通过对 GN02 菌株的全基因组扫描，其多糖代谢相关基因表达蛋白的统计分析如下：共匹配(hit)到 21 个与多糖相关的基因蛋白，如表 2 所示。结果表明，这些多糖相关的基因表达的蛋白大部分是属于菌体结构多糖，如脂多糖合成及代谢相关的蛋白；还发现了与菌体荚膜多糖相关的蛋白 CCI74471.1，验证了 GN02 菌株确实具有荚膜；另外，还发现了与胞外多糖合成及分泌有关的蛋白 WP_000727299.1、WP_053065605.1、WP_071582567.1 等，表明 GN02

表 2 GN02 菌株多糖代谢相关蛋白分析

Table 2 Analysis of genes related to polysaccharide metabolism in GN02 strain

匹配蛋白名称 Hit_name	匹配蛋白描述 Hit_description	匹配蛋白的长度 Hit_length (bp)	一致性 Identity (%)
WP_064180600.1	脂多糖生物合成蛋白双结构域糖基转移酶	256	99.61
WP_042947939.1	Lipopolysaccharide biosynthesis protein, two-domain glycosyltransferase 脂多糖庚糖基转移酶III	358	99.72
ACI07827.1	Putative lipopolysaccharide heptosyltransferase III 脂多糖 1,2-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶	359	100
CCZ99657.1	Putative lipopolysaccharide 1,2-N-acetylglucosaminetransferase 脂多糖生物合成核心蛋白	302	99.67
WP_064144419.1	Putative lipopolysaccharide core biosynthesis protein 脂多糖庚糖基转移酶	323	99.69
WP_072121771.1	Lipopolysaccharide heptosyltransferase 多糖脱乙酰酶	318	98.11
WP_087833476.1	Putative polysaccharide deacetylase 脂多糖 ABC 转运蛋白底物结合蛋白	181	100
WP_080897330.1	Lipopolysaccharide ABC transporter substrate-binding protein 脂多糖质膜分泌蛋白	191	98.95
WP_000727299.1	Lipopolysaccharide exporter periplasmic protein 多糖分泌蛋白	378	98.41
WP_032420268.1	Polysaccharide export protein 脂多糖生物合成蛋白	483	96.48
WP_053065605.1	Lipopolysaccharide biosynthesis protein 胞外多糖生物合成蛋白	316	98.41
BAU58953.1	Exopolysaccharide biosynthesis protein ABC-型多糖/多元醇磷酸分泌渗透酶	234	100
WP_061154904.1	ABC-type polysaccharide/polyol phosphate export permease 脂多糖组装蛋白	389	99.74
WP_071582567.1	Lipopolysaccharide assembly protein 糖蛋白-多糖代谢蛋白	163	99.39
WP_064171244.1	Glycoprotein-polysaccharide metabolism protein 多糖脱乙酰酶蛋白家族	417	99.46
WP_049164667.1	Polysaccharide deacetylase familiy protein 脂多糖 ABC 转运蛋白水解酶	360	99.72
CEL87612.1	Lipopolysaccharide ABC transporter permease 与生物膜形成相关的假定多糖脱氢酶	673	99.85
WP_046878950.1	Putative polysaccharide deacetylase associated with biofilm formation 脂多糖 N-乙酰甘露糖尿苷转移酶	246	99.59
WP_012969198.1	Lipopolysaccharide N-acetylmannosaminouronosyl transferase 多糖生物合成蛋白	416	99.76
WP_064169628.1	Polysaccharide biosynthesis protein 脂多糖生物合成蛋白	224	99.44
CCI74471.1	Lipopolysaccharide biosynthesis protein 荚膜多糖的生物合成 Capsular polysaccharide biosynthesis	349	100

菌株不仅能起到固氮的作用(其基因组中包含 *nif*HDK 等完整的固氮基因群)，还能合成分泌胞外多糖，其相关蛋白的分析可为将来植物促生作用的相关性研究提供理论基础依据。

2.4 *K. variicola* GN02 菌株胞外多糖理化性质、结构解析

2.4.1 理化性质

提取率：100 mL GN02 菌株的发酵液中最终获得干燥产品 0.69 g，即多糖得率为 6.90 g/L。

一般理化性质鉴定：所提取的 GN02 菌株胞外多糖的理化性质鉴定见表 3，结果表明所提出的产物符合多糖为粉末状样品，易溶解于水，$AgNO_3$ 反应、硫酸甲萘酚反应、硫酸蒽酮反应阳性，茚三酮反应阴性，符合多糖的基本理化性质特征。GN02 菌株胞外多糖与 β-葡萄糖苷酶水解反应呈阳性、与 α-葡萄糖苷酶水解反应呈阴性，表明该多糖可能是 β 构型的多糖，而不是 α 构型。

纯度鉴定：GN02 菌株胞外多糖紫外光谱分析见图 3，该多糖最大吸收峰位于 200 nm 处，但未发现有蛋白质(280 nm)和核酸(260 nm)的吸收峰，表明 GN02 胞外多糖所含的其他杂质较少、多糖的纯度较高。

分子量测定：经 SephadesG-200 层析柱层析，测定 GN02 菌株胞外多糖分子量约为 1.8×10^3 Da。

比旋度和特性黏度的测定：GN02 菌株胞外多糖比旋度为$[\alpha]_D^{25}$ 为 75°，粘度$[\eta]$为 80.28。

2.4.2 结构解析

多糖组分鉴定：薄层层析色谱分析表明，GN02 菌株胞外多糖可能由葡萄糖、半乳糖和甘露糖组成(图 4)。

糖苷键分析：GN02 菌株胞外多糖高碘酸氧化法及 Smith 降解测定结果如表 4 所示，多糖样品中检测出甘油和葡萄糖，高碘酸的消耗是甲酸生成量的 1.5 倍，按 Smith 降解产物与糖苷键关系判断[15]，GN02 菌株胞外多糖具有的糖苷键连接可能是(1→3)及(1→6)。

多糖结构解析：GN02 菌株胞外多糖红外光谱仪扫描结果如图 5 所示，该多糖在波长 890 nm 处有 β 多糖的特征吸收峰，结合葡萄糖苷酶水解反应，验证了该多糖为 β 构型；此外，还发现该多糖在 198−100 nm 处有氢键振动的吸收频率特征吸收峰；1 100−1 010 nm 处有呋喃糖苷特征吸收峰；1 421−1 374 nm 有−CH_2 的变形吸收峰；1 550 nm、1 650 nm 处有酯胺特征吸收峰；1 638 nm 处有−OH 的弯曲振动吸收峰；2 920−2 850 nm 处有 C−H 的伸缩振动峰；3 600−3 000 nm 处有−OH、−S 振动峰[24]。

表 3 GN02 菌株胞外多糖理化性质鉴定

Table 3 Identification of physicochemical properties of extracellular polysaccharide from GN02 strain

GN02 菌株胞外多糖 Extracellular polysaccharide of GN02 strain	反应的结果及现象 Results and phenomena of reaction	结果判定 Result determination
基本特征 Basic feature	乳白色粉末状、无味、易被空气氧化、氧化后颜色呈棕土色 Milky white powder, tasteless, easy to be oxidized by air, brown soil color after oxidation	
溶解性 Solubility	易溶于水、不溶于乙醇、乙醚、丙酮 Easy soluble in water, but insoluble in ethanol, ether and acetone	
$AgNO_3$ 反应 $AgNO_3$ reaction	阳性 Positive	多糖特征性反应 Characteristic reaction of polysaccharide
茚三酮反应 Ninhydrin reaction	阴性 Negative	不含蛋白质成分 Contain no protein components
葡萄糖苷酶水解反应 Glycosidase hydrolysis reaction	α-葡萄糖苷酶阴性；β-葡萄糖苷酶阳性 α-glucosidase negative; β-glucosidase posies	可能是 β 结构型多糖 Maybe β-structured polysaccharide
硫酸甲萘酚反应 Cresol sulfate reaction	阳性 Positive	多糖特征性反应 Characteristic reaction of polysaccharide
硫酸蒽酮反应 Anthranone sulfate reaction	阳性 Positive	多糖特征性反应 Characteristic reaction of polysaccharide

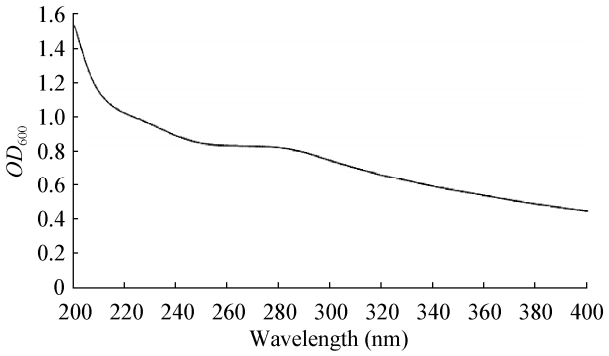

图 3 GN02 菌株胞外多糖紫外光谱扫描图谱

Figure 3 The ultraviolet spectrum of extracellular polysaccharides extracellular from GN02 strain

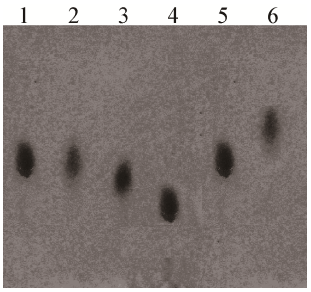

图 4 GN02 菌株胞外多糖薄层层析色谱图

Figure 4 Thin-layer chromatogram of polysaccharides from GN02 strain

注：1：GN02 菌株胞外多糖；2：葡萄糖；3：半乳糖；4：阿拉伯糖；5：甘露糖；6：鼠李糖.

Note: 1: Extracellular polysaccharide of GN02 strain; 2: Glucose; 3: Galactose; 4: Arabinose; 5: Mannose; 6: Rhamnose.

表 4 GN02 菌株胞外多糖 Smith 降解反应

Table 4 The Smith reaction of extracellular polysaccharide from GN02 strain

样品 Sample	消耗高碘酸 Consumption of periodate (mL)	甲酸生产量 Formic acid production (mL)	高碘酸：甲酸 (平均每摩尔比值) Periodate：Formic acid (average molar ratio)	Smith 降解产物 Smith degradation products
空白 Blank	–	–	–	–
GN02 菌株胞外多糖 Extracellular polysaccharide of GN02 strain	25.50	0.15	3：2	甘油、葡萄糖 Glycerol, glucose

注：–：不能发生反应，无测定数值.

Note: –: No reaction can occur and that there was no measured value.

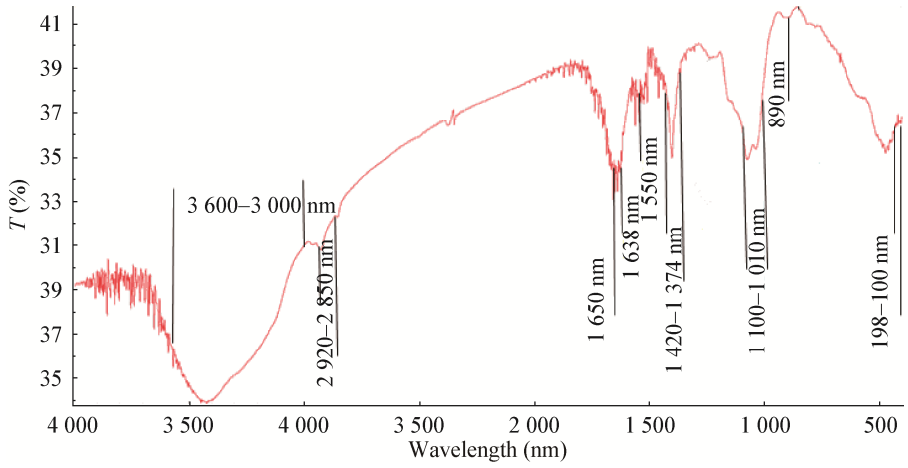

图 5 GN02 菌株胞外多糖红外光谱分析图

Figure 5 The infrared spectrum of extracellular polysaccharides from GN02 strain

3 讨论与结论

本研究报道了禾本科植物巨菌草内生固氮菌 *K. variicola* GN02 菌株的基因序列注释和经典固氮菌 *K. pneumoniae* 34 基因注释的比对，表明两者间在基因组大小、(G+C)mol%含量、蛋白编码序列、平均大小和 RNA 基因数目等方面均较为相似，但是 *K. variicola* GN02 内没有质粒。重点分析了 *K. variicola* GN02 菌株基因组中许多与氮代谢和多糖合成、分泌相关的基因及其蛋白和胞外多糖的特性。

蛋白质、氨基酸、碳水化合物合成和其代谢活动是菌体细胞的最基本的生命活动。eggNOG 和 KEGG 分类注释表明，*K. variicola* GN02 菌株中有大量的基因广泛参与了 C、N 代谢的过程。固氮菌所含的固氮酶对氧极其敏感，在一切氧条件下固氮菌的固氮酶均会失活从而丧失了固氮催化反应的能力。因此，某些植物内生固氮菌通过自身演化生成了多种机制来解决其固氮催化反应过程中既需氧又防氧的矛盾[25]，如在低氧条件下，有些植物内生固氮菌通过分泌胞外多糖来控制进入固氮菌菌体细胞的氧浓度[8,26]；胞外多糖还能有助固氮菌抵抗干燥、寡营养等不良环境，因此，能高产胞外多糖也成为了固氮菌筛选的一种指标[27]。有研究表明，不同血清型克雷伯氏菌属细菌其胞外多糖的结构和单糖组成不同，其组成的单糖有葡萄糖、半乳糖、岩藻糖、甘露醇等，各单糖链接的糖苷键也不一致，有些多糖的糖链上还携带了乙酰基、丙酮酸、糖醛酸等不同类型的化学基团。

植物内生菌不仅停留在根部，还可以向植物的茎、叶迁移[28-29]。最近研究表明，一旦菌进入植物内部就会使数千个植物基因得到表达，产生多种代谢活动的物质促进植物生长[30]。本研究仅对 *K. variicola* GN02 菌株分泌胞外多糖的相关蛋白、理化性质和结构特性进行解析，特别是多糖分泌蛋白 WP_000727299.1 、WP_053065605.1 、WP_071582567.1 的发现，有助于进一步了解固氮菌分泌多糖的机理。除此之外，还有很多相关基础研究需要深入，为该菌制作固氮菌肥促进作物生长、提高作物产量奠定坚实基础。

REFERENCES

[1] Prakamhang J, Minamisawa K, Teamtaisong K, et al. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Applied Soil Ecology, 2009, 42(2): 141-149

[2] Huang SF, Gao C, Liu LH, et al. Research methods and trend of phylogenetic evolution of endophytic diazotrophs[J]. Microbiology China, 2018, 45(1): 181-190 (in Chinese)
黄淑芬, 郜晨, 刘丽辉, 等. 植物内生固氮菌系统发育进化新进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 181-190

[3] Lin BS, Chen Y, Luo MC, et al. Research on the toxicity and nitrogen fixation capacity of endophytic nitrogen-fixing bacteria *Klebsiella variicola* GN02 from *Pennisetum sinense* Roxb[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 47(24): 258-261 (in Chinese)
林标声, 陈意, 罗茂春, 等. 巨菌草内生固氮菌 *Klebsiella variicola* GN02 毒理性与固氮能力[J]. 江苏农业科学, 47(24): 258-261

[4] Zhang KK, Xing YX, Shao M, et al. Cloning, prokaryotic expression and proteinpurification of sugarcane endogenous azotobacter *klebsiella variicola* DX120 Enifk gene[J]. International Research Journal of Natural and Applied Sciences, 2015, 2(6): 69-85

[5] Rodríguez-Blanco A, Sicardi M, Frioni L. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.)[J]. Biology and Fertility of Soils, 2015, 51(3): 391-402

[6] Li MJ, Peng S, Xu SZ, et al. Application of *Klebsiella* spp. in agriculture and environmental management[J]. Current Biotechnology, 2014, 4(6): 415-420 (in Chinese)
李梦娇, 彭晟, 徐绍忠, 等. 克雷伯氏菌在农业与环境治理上的应用[J]. 生物技术进展, 2014, 4(6): 415-420

[7] Lin BS, Wang LF, Zhang KL, et al. Study on effect of interaction between endophytic diazotrophs from *Pennisetum* sp. and P-releasing bacteria and manufacture of their compound bacterial fertilizer[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(13): 281-283 (in Chinese)
林标声, 汪丽芳, 张凯丽, 等. 巨菌草内生固氮菌与解磷菌互作效应及其混合菌肥制备[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(13): 281-283

[8] Xu YJ, Zhao LF. The research on rhizobia exopolysaccharides' structure and function[J]. Journal of Shangqiu Vocational and Technical College, 2009, 8(2):

96-98 (in Chinese)
徐亚军, 赵龙飞. 根瘤菌胞外多糖的结构与功能性研究[J]. 商丘职业技术学院学报, 2009, 8(2): 96-98

[9] Li JH, Yuan D, Lu JM, et al. Effects of nitrogen fertilizer on the expression of *nifH* gene of endophytic azotobacter in sugarcane leaves[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(7): 100-106 (in Chinese)
李佳慧, 袁丹, 陆建明, 等. 氮肥对甘蔗叶片内生固氮菌 *nifH* 基因表达的影响[J]. 生物技术通报, 2017, 33(7): 100-106

[10] Sharma S, Singh DK. Temporal variations in diazotrophic communities and *nif*H transcripts level across the agricultural and fallow land at Jaipur, Rajasthan, India[J]. Indian Journal of Microbiology, 2017, 57(1): 92-99

[11] Li QJ, Cheng JJ, Sun SX, et al. Isolation, identification and characterization of associative nitrogen-fixing endophytic bacterium *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A in maize[J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2456-2463 (in Chinese)
李琼洁, 程杰杰, 孙帅欣, 等. 玉米联合固氮菌 *Kosakonia radicincitans* GXGL-4A 的分离鉴定与固氮特性研究[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2456-2463

[12] Dou C, Du J, Ji XJ, et al. Research progress in the fermentative production of exopolysaccharides by *Klebsiella* sp.[J]. China Biotechnology, 2010, 30(12): 123-127 (in Chinese)
窦畅, 杜军, 纪晓俊, 等. 克雷伯氏菌生产胞外多糖的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(12): 123-127

[13] Cui NN, Zhao M, Li N, et al. Medium Qptimization and emulsifying property of exopolysaccharide produced by *Klebsiella* sp. PHRC1.001[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(21): 38-42 (in Chinese)
崔娜娜, 赵萌, 李娜, 等. 克雷伯氏菌胞外多糖的发酵培养基优化及乳化性质[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(21): 38-42

[14] Yan YN. Effect of polysaccharide-producing plant growth-promoting bacteria on potassium unitization of wheat and the mechanism[D]. Nanjing: Master's thesis of Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)
闫亚南. 产胞外多糖植物促生菌对小麦高效利用钾肥的影响及机制研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2012

[15] Li J. Study and application of a high polysaccharide-producing strain[D]. Guiyang: Master's thesis of Guizhou University, 2006 (in Chinese)
李静. 一株多糖高产菌株的研究与应用[D]. 贵阳: 贵州大学硕士论文, 2006

[16] Wang P. Functional analysis of exopolysaccharide biosynthesis in *Mesorhizobium tianshanense*-plant host interaction[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2010 (in Chinese)
王鹏. 中慢生天山根瘤菌胞外多糖在共生过程中的功能研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2010

[17] Cross AS, Sadoff JC, Kaufman B, et al. Use of monoclonal antibody combinations in the prevention of bacteremia caused by *Escherichia coli* O18:K1:H7[J]. Serodiagnosis and Immunotherapy in Infectious Disease, 1988, 2(2): 127-136

[18] Yang QY, Huang Y, Chen YB, et al. Screening of optimal DNA extraction methods and the bacterial community composition of yak rumen revealed by high 16S rRNA throughput sequencing[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(5): 932-941 (in Chinese)
杨琦玥, 黄勇, 陈亚冰, 等. 16S rRNA 高通量测序技术筛选牦牛瘤胃细菌基因组 DNA 提取方法及菌群结构[J]. 中国农业科学, 2017, 50(5): 932-941

[19] Liu JX, Zhao Z, Deng YP, et al. Complete genome sequence of *Vibrio campbellii* LMB 29 isolated from red drum with four native megaplasmids[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2035

[20] Huang SH, Chen QM, Chen RH, et al. Purification and identification of polysaccharide from loquat leaf[J]. Food Research and Development, 2017, 38(4): 42-48 (in Chinese)
黄素华, 陈秋妹, 陈瑞红, 等. 枇杷叶多糖的分离纯化及组分鉴定[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(4): 42-48

[21] Lin BS. Studies on the fermentation, isolated and determination for physical, chemical and structure characteristics of pachyman[D]. Kaifeng: Master's Thesis of Henan University, 2008 (in Chinese)
林标声. 茯苓多糖的发酵、提取及其理化、结构性质鉴定的研究[D]. 开封: 河南大学硕士学位论文, 2008

[22] Zhu NN, Sun ZR, Qu JX, et al. Analysis and identification of integral structure of *Dendrobium officinale Kimura* et Migo, *Dendrobium nobile* Lindl. and *Dendrobium chrysotoxum* Lindl. and their extracts by infrared spectroscopy[J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2018, 38(11): 3407-3413 (in Chinese)
朱南南, 孙志蓉, 曲继旭, 等. 三种石斛及其提取物的红外光谱法整体结构解析与鉴定[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(11): 3407-3413

[23] Fouts DE, Tyler HL, Deboy RT, et al. Complete genome sequence of the N_2-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice[J]. PLoS Genetics, 2008, 4(7): e1000141

[24] Xia CH, Dai Q, Fang W, et al. Research on the IR spectrscopy of kinds of polysaccharide[J]. Journal of Wuhan University of Technology, 2007, 29(1): 45-47 (in Chinese)
夏朝红, 戴奇, 房韦, 等. 几种多糖的红外光谱研究[J]. 武汉理工大学学报, 2007, 29(1): 45-47

[25] Zhao YF, Yang F, Zheng YG, et al. The injury of nitrogenase MoFe protein by activated oxygen radicals[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Jilinensis, 1994(4): 78-82 (in Chinese)
赵云峰, 杨峰, 郑莹光, 等. 活性氧自由基对固氮酶(钼铁蛋白)的损伤[J]. 吉林大学自然科学学报, 1994(4): 78-82

[26] Fang XJ, You CB. Gene regulation of biosynthesies of acidic exoploysaccharides in diazotrophs[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 1995, 3(1): 21-27 (in Chinese)
方宣钧, 尤崇杓. 固氮菌酸性胞外多糖生物合成的基因调控(综述)[J]. 农业生物技术学报, 1995, 3(1): 21-27

[27] Deng C, Du XJ, Huang T, et al. The promotion of proper carbon nitrogen ratio in the synthesis of extracellular polysaccharide by nitrogen-fixing strains WN-F[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(3): 194-199 (in Chinese)
邓超, 杜秀娟, 黄涛, 等. 碳氮比对固氮菌株 WN-F 合成胞外多糖的影响[J]. 生物技术通报, 2018, 34(3): 194-199

[28] Chi F, Shen SH, Cheng HP, et al. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7271-7278

[29] Ji KX, Chi F, Yang MF, et al. Movement of rhizobia inside tobacco and lifestyle alternation from endophytes to free-living rhizobia on leaves[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(2): 238-244

[30] Wu QQ, Peng XJ, Yang MF, et al. Rhizobia promote the growth of rice shoots by targeting cell signaling, division and expansion[J]. Plant Molecular Biology, 2018, 97(6): 507-523

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年，月刊，是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办，国内外公开发行，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊，中国科技核心期刊，CSCD 核心期刊，曾获国家优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计，本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”，并入选“中国精品科技期刊”，成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2020 年每册定价 130 元，全年 1560 元，我们免邮费寄刊。

邮购地址：(100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel：010-64807511；E-mail：bjb@im.ac.cn，tongbao@im.ac.cn

网址：http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn

国内邮发代号：2-817；国外发行代号：M413