

一株产类胡萝卜素细菌的分离与鉴定

张 勇^{1,2} 吴 刚² 杨宝玉¹ 陈士云¹ 宋冬林¹

(1. 中国科学院武汉病毒研究所 武汉 430074; 2. 华中师范大学生命科学学院 武汉 430079)

摘要:从武汉东湖发生水华的水样中分离到一株产橙黄色色素的菌株OB-2,经可见光光谱扫描分析,证明该菌株所产色素为类胡萝卜素。为了确定OB-2的分类学地位,PCR扩增后测定其16S rRNA基因序列,在GenBank中进行同源性比较,并与一些相关细菌构建系统发育树。综合分析后将菌株OB-2鉴定为*Microbacterium kitamense*。

关键词:类胡萝卜素;微杆菌;16S rRNA;系统发育学分析

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)02-0206-04

类胡萝卜素(Carotenoids)是一类具重要应用价值的天然色素,迄今已被鉴定的类胡萝卜素多达600多种,可广泛应用于食品、医药、化妆品等领域^[1,2]。利用微生物生产类胡萝卜素是获得生物资源型类胡萝卜素的重要途径,不同微生物所产类胡萝卜素的种类和组成不尽相同,研究和发掘新的产类胡萝卜素微生物资源对于开发和利用天然色素具有重要的意义。目前对产类胡萝卜素微生物菌种的分离与产生色素的鉴定已有许多报道,而且还报道了一些与类胡萝卜素生物合成有关的基因及转基因植物^[3]。

本文报道从东湖发生水华的水域中分离的一株产橙黄色类胡萝卜素菌株OB-2的鉴定结果。在对该菌株形态观察及生理生化测定结果的基础上,进一步分析该菌的16S rRNA基因序列,并与一些相关细菌构建了系统发育树。为进一步研究合成类胡萝卜素的遗传背景、分析其代谢途径,分析菌株间的亲缘关系及开发利用天然类胡萝卜素资源提供基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集及菌种分离 水样采自东湖渔场的水华发生晚期的水体中。利用营养肉汤培养基,通过稀释倒平板法将水样于28℃培养和分离溶藻细菌(*Algae-lysing bacteria*)^[4]时,发现培养得到的有些菌落颜色多样,经分离纯化后取单菌落划线培养保存。其中OB-2菌株的菌落呈橙黄色,对其进行进一步研究。

1.2 色素的提取与鉴定 色素的提取方法参考文献[5]进行。将保存的菌种活化后接种于盛有50mL培养基的250mL三角瓶内,于摇床28℃、200r/min振荡培养48h后,8000r/min离心10min收集菌体细胞。所得细胞用甲醇60℃处理15min抽提色素,然后按1:9的比例加入乙醚:石油醚萃取,取上层在避光的条件下蒸发至干。然后用丙酮溶解,用Perkin Elmer Lambda 25 UV/VIS分光光度计在300—600nm波长下扫描。

1.3 形态观察及生理生化试验 利用光学显微镜与电子显微镜观察该菌的菌体形态与大小。参考文献[6]对该菌进行简单的形态观察和生理生化测定。

1.4 16S rDNA的序列测定和分析 为确定菌株OB-2的分类学位置,测定了其16S rDNA序列,并与其它细菌的16S rDNA序列进行比较分析。

1.5 16S rDNA序列的PCR扩增与测试 菌株OB-2转入LB培养基培养48h,吸取0.5mL菌液于Eppendorf管中,沸水浴10min,8000r/min离心5min,上清液作为模板DNA直接用于PCR扩增。用于扩增16S rRNA基因的PCR反应引物为一对通用引物。正向引物BSF8: 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' (*Escherichia coli*的16S rDNA对应位置为8—27),反向引物BSR1541: 5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3' (*E. coli*的16S rDNA对应位置为1541—1522)。在50μL的PCR反应体系中含有:1×PCR缓冲液,

收稿日期: 2003-12-23; 修订日期: 2004-11-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(40202011)

作者简介: 张勇,(1976—),男,湖北大冶人;硕士研究生;主要从事微生物生态及遗传研究

通讯作者: 宋冬林, dlsong@pentium.whiov.ac.cn

1.5mmol/L MgCl₂, 4× dNTP 混合物各 200 μ mol/L, 引物各 0.2 μ mol/L TaqDNA 聚合酶 1U, 1 μ L 模板 DNA。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5min, 94 °C 变性 1min, 56 °C 复性 1min, 72 °C 延伸 1min, 30 个循环, 最后 72 °C 温育 7min。PCR 反应在 MJ-2400 型热循环仪上进行。取 5 μ L 反应液在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。PCR 扩增产物经 Omega 试剂盒纯化后, 由上海中科开瑞生物芯片科技公司进行序列测定。

1.6 16S rDNA 的同源性比较及系统发育分析 将测定的 16S rDNA 的部分序列在 GenBank 中进行同源性比较。调取 GenBank 数据库中与之同源性较高细菌及已报道产类胡萝卜素细菌的 16S rDNA 序列, 采用 Clustalx 1.83 软件进行多序列匹配排列(Multiple alignments), 用系统发生推断软件包 PHYLIP3.6 进行统计和聚类分析。用 Kimura 双参数模型计算各序列分化距离, 缺少和不确定的位点在计算中被省略。采用邻接法(Neighbor joining method)获得分支系统发生树, 并通过自举分析(Bootstrap)进行置信度检测, 自举数据集为 1000 次。

2 结果

2.1 形态及生理生化特征

菌株 OB-2 于 28 °C 在 LB 平皿上培养 48h, 菌落呈橙黄色, 菌落直径约 1—2mm, 色素非水溶性。细胞短杆状, 无分支, 单个或成对, 有的排列成直角或 V 字形(图 1)。幼龄阶段其革兰氏染色阳性, 接触酶反应阳性, 不形成内生孢子, 不抗酸, 好氧, 发酵葡萄糖产酸不产气。化能异养菌, LB 培养基比营养肉汤培养基更适合其生长。



图 1 菌株 OB-2 的电镜照片($\times 20000$)

Fig. 1 Electron micrograph of strain OB-2 ($\times 20000$)

2.2 色素鉴定

在 300—600nm 波长范围扫描检测提取的色素样品, 最大吸收峰为 469nm, 在其两侧 442nm 和 501nm 波长有两个明显的肩峰(图 2), 这是类胡萝卜素具有的特征性吸收曲线^[1-7]。

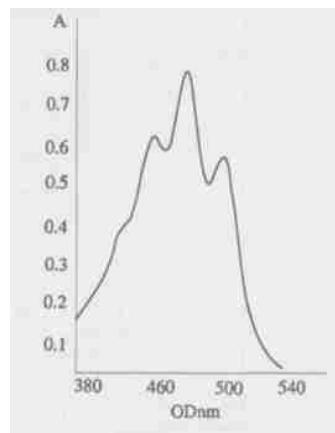


图 2 色素的可见光扫描图谱

Fig. 2 Visible light scan spectrum of pigment

2.3 16S rDNA 扩增产物

根据 DNA 标准分子量, 在约 1.5kb 处有一条目的扩增产物, 与预期产物大小相同(图 3)。

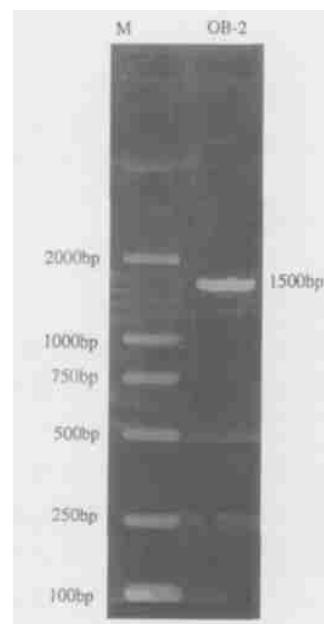


图 3 PCR 扩增的 16S rDNA

Fig. 3 PCR amplified 16S rDNA M. DNA Marker DL2000; OB-2

2.4 16S rDNA 序列的同源性比较

将菌株 OB-2 的 16S rDNA 序列测序结果输入 GenBank 以 BLAST 软件进行序列同源性比较, 结果显示 OB-2 的序列与微杆菌属(*Microbacterium*)的多种细菌具有很高的同源性。OB-2 在 GenBank 中的

序列登录号为 AY262001。

2.5 系统发育分析

从 GenBank 中调出已有合法种名的微杆菌属模

式菌株及已报道产类胡萝卜素细菌的 16S rDNA 序列与 OB-2 菌株构建系统发育树, 以与微杆菌属亲缘关系较近的 *Brevibacterium linens* 为外群(图 4)。

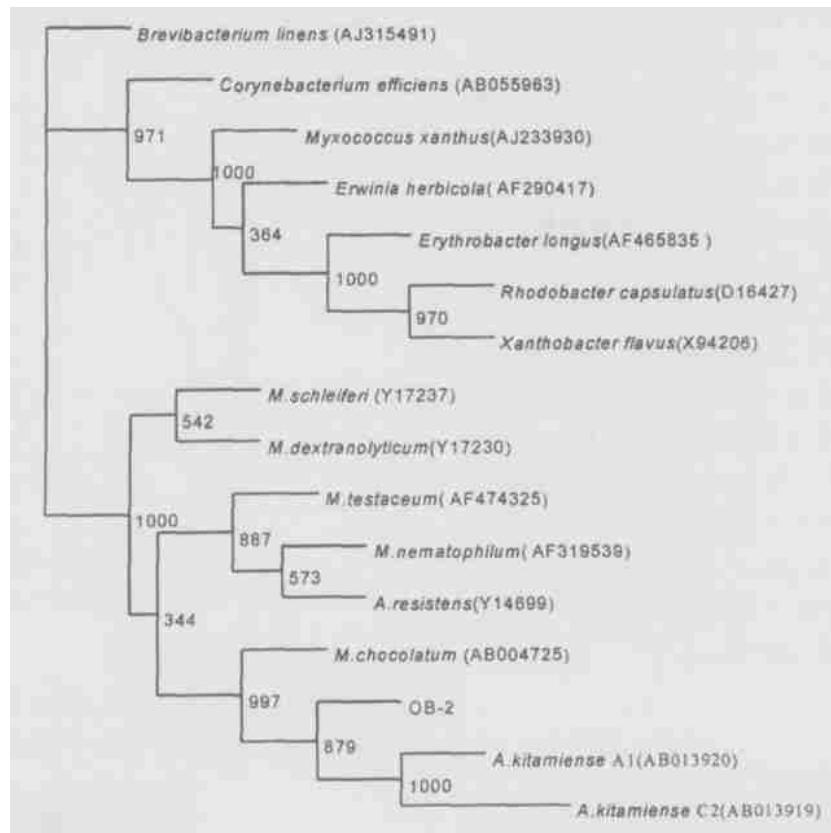


图 4 基于 16S rDNA 序列的系统发育树(括号内为序列登录号)

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence (accession numbers in parentheses)

3 讨论

3.1 菌株来源与色素相关性

水样来源于水华发生晚期的东湖水体, 最初的目的是从中分离溶藻细菌。随机分离各种细菌后分别进行溶藻实验时发现, 虽然分离的纯培养物溶藻作用不很稳定, 但有色泽的细菌群具有溶藻作用发生的现象明显高于无色细菌群, 表明在本研究中溶藻细菌与产色素细菌群之间存在一定的相关性。菌株 OB-2 就有一定的溶藻能力。由于该菌产生的色素为类胡萝卜素, 且特征峰较特别, 而且也未见研究报道, 所以值得深入研究。

3.2 色素鉴定

类胡萝卜素通常在可见光波长范围有一个明显的特征性双肩吸收峰, 但其最大吸收峰的波长、左右两肩峰的波长等在没有杂质干扰的情况下, 不同类胡萝卜素呈不同的曲线特征。从菌株 OB-2 培养物中提取的色素分析, 明显不同于 β -胡萝卜素所具有

的特征性双肩峰而与番茄红素的特征相近, 但其左肩峰高于右肩峰的特点又与番茄红素不尽相同^[1], 进一步的结论需进行 HPLC 分析后确定。

3.3 菌株鉴定

在 GenBank 中通过 BLAST 软件比较的结果表明菌株 OB-2 与微杆菌属细菌具有较高的同源性, 其中与 *Aureobacterium kitamiense* 的同源性最高, 为 99%。Takeuchi^[8] 等建议将金杆菌属 (*Aureobacterium*) 和微杆菌属 (*Microbacterium*) 这两个属统一为微杆菌属。现在 GenBank 中虽然仍存在金杆菌属的一些种类, 但实际上已将它们归为微杆菌属。如 *A. kitamiense* 实为 *M. kitamiense*, *A. liquefaciens* 实为 *M. liquefaciens*。一般认为, 16S rDNA 序列同源性小于 97%, 可以认为属于不同的种, 同源性小于 93%—95%, 可以认为属于不同属^[9,10]。系统发育树也表明 OB-2 与 *A. kitamiense* 的亲缘关系最近, 这进一步证明了同源性比较的结果。而且 OB-2 的菌株特征和微杆菌属(金杆菌属)的主要生理生化特征相符。因此将 OB-2 鉴定为

Microbacterium kitamiense strain OB-2.

目前还未见到有产类胡萝卜素的微杆菌的报道。该菌的发现为产类胡萝卜素的微生物增添了新的成员。从该菌的系统发育关系分析,与已报道的产类胡萝卜素的高G+C%的革兰氏阳性菌短杆菌、棒状杆菌的亲缘关系较近一些,所以对进一步分析该菌合成类胡萝卜素途径及遗传背景,有重要的参考价值。同时,在这些研究工作的基础上可能进一步揭示合成类胡萝卜素基因的演化与细菌发育及生境之间的关系。

参考文献:

- [1] Wang Y Q, Li Q S. Natural Carotenoids—Advances of Researches Production, Application [M]. Beijing: China medical technology press [王业勤, 李勤生. 天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用. 北京: 中国医药科技出版社, 1997]
- [2] Zhu Y F, Mai K S. A Review of Carotenoid of Pigmentation Additives in Fish Feeds [J]. *Acta Hydrobiol. Sinica*, 2003, 27(2): 196—200. [朱艺峰, 麦康森. 鱼饲料着色剂类胡萝卜素研究进展. 水生生物学报, 2003, 27(2): 196—200]
- [3] Tao J, Zhang S L, Xu C J, et al. Gene and Gene Engineering of Carotenoid Biosynthesis [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*. 2002, 18(3): 276—281 [陶俊, 张上隆, 徐昌杰, 等. 类胡萝卜素合成的相关基因及其基因工程. 生物工程学报, 2002, 18(3): 276—281]
- [4] Wu G, Xi Y, Zhao Y J. The Latest Development of the Research on Algae-lysing Bacteria [J]. 2002, 15(5): 43—46 [吴刚, 席宇, 赵以军. 溶藻细菌研究的最新进展. 环境科学研究, 2002, 15(5): 43—46]
- [5] Viveiros M, Knoblauch P, Sandmann, et al. Structural and functional analysis of the gene cluster encoding carotenoid biosynthesis in *Mycobacterium aurum* A⁺ [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 187: 95—101
- [6] Dong X Z, Chai M Y, et al. Manual of Systematic Determination of Familiar Bacteria [M]. Beijing: Science press, 2001. [东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001]
- [7] Huang J, Liu J G. Methods for Carotenoids Analysis and Determination. [J]. *Journal of Qingdao Institute of Chemical Technology*, 2001, 22(3): 223—227. [黄健, 刘建国. 类胡萝卜素的分析测定. 青岛化工学院学报, 2001, 22(3): 223—227]
- [8] Takeuchi M, Hatano K. Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins, et al. in a redefined genus *Microbacterium*. [J]. *Inter. J. System. Bacteriol.*, 1998, 48: 739—747
- [9] Devereux R, HE S H, Doyle C L, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family [J]. *Bacteriol.*, 1990, 172: 3609—3619
- [10] Fry N K, Warwick S, Saunders N A, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae [J]. *J. Gen. Microbiol.*, 1991, 137: 1215—1222

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ONE CAROTENOID-PRODUCING BACTERIUM

ZHANG Yong^{1,2}, WU Gang², YANG Bao-Yu¹, CHEN Shi-Yun¹ and SONG Dong-Lin¹

(1. Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071;

2. College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079)

Abstract: Carotenoids represent one of the most widely distributing and structurally diverse classes of natural pigments. Over 600 different carotenoids have been found in nature and some of them are widely used in foods, feeds, pharmaceuticals and cosmetics. Some microorganisms have the ability to synthesize carotenoids with complex structures. The microorganism could be used to produce carotenoids. One strain OB-2 which generates an orange pigment was isolated from water samples in East Lake, Wuhan, where algae blooms were serious. By visible light spectrum scanning, this pigment was estimated as carotenoids. For confirming the classification of OB-2, morphological, physiological and biochemical characterization were applied and PCR was carried out to measure the gene sequence of 16S rRNA. The 16S rDNA of OB-2 was compared with GenBank and the phylogenetic tree was constructed by the neighbour-joining method with related bacteria. The topology of the phylogenetic tree was evaluated by the bootstrap resampling method with 1000 replicates. Gram stains showed that they are gram-positive rods which were arranged as single cells or gemination in young cultures. The basic physiological and biochemical screening reactions were as follows: 1) Obligately aerobic. Slow and weak oxidative production of acid from glucose. 2) Catalase-positive. Do not form it endospores. Not acid-fast. Colonies on LB media are 1 to 2 mm in diameter within 48 hours at 28 °C, and exhibit a orange pigment. An nearly complete 16S rRNA gene sequence of OB-2 (GenBank accession number: AY262001) was obtained. Sequence analysis based on 16S rDNA suggested that the bacterium was phylogenetically related to members of the genus *Microbacterium* and *Microbacterium kitamiense* was the closest relative species of OB-2 with 99 % sequence similarity. Similar result was clearly showed in the phylogenetic dendrogram. The strain OB-2 was identified as *Microbacterium kitamiense*.

Key words: Carotenoid; *Microbacterium*; 16S rRNA; Phylogenetic analysis