

# 产糖化酶的类芽孢杆菌 S3 菌株的多相分类鉴定

李 懿<sup>1</sup>, 杨子松<sup>1</sup>, 后藤庆一<sup>2</sup>

(1. 阿坝师范学院, 四川 汶川 623002; 2. 日本三井农林株式会社, 东京 105-8427)

**摘要:**本研究从甘薯种植地、淀粉厂厂区及下水道等有机质丰富的地方采取土样,从中分离产糖化酶细菌。其中一株命名为 S3 的分离菌株,根据形态特征观察、生理生化性状检测、全细胞脂肪酸成分分析、16S rDNA 序列分析 DNA-DNA 杂交等鉴定实验结果表明属于类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)。根据 16S rDNA 序列构建的系统发育树,与 S3 进化距离相近的类芽孢杆菌菌种分别为:*P. curdolanolyticus*、*P. kobensis* 和 *Paenibacillus* sp. PALXIL08。但是,S3 菌株在生理生化特征及细胞脂肪酸成分含量等都与这 3 种菌有所不同;DNA-DNA 杂交实验表明 S3 和这 3 种菌的同源性分别为 37.8%、21.7% 和 29.4%。因此,S3 菌株可能是类芽孢杆菌的一个新种。

**关键词:**类芽孢杆菌;16S rRNA;DNA-DNA 杂交

中图分类号:Q93-3

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2021)03-0058-06

## Polyphasic Taxonomic Identification of *Paenibacillus* Strain S3 Producing Saccharifying Enzyme

LI Yi<sup>1</sup>, YANG Zisong<sup>1</sup>, Goto Keiichi<sup>2</sup>

(1. *Aba Teachers University, Wenchuan 623002, China*; 2. *Mitsui Norin Co., Ltd., Tokyo 105-8427, Japan*)

**Abstract:** In this study, soil samples were collected from cropland, starch plant and sewerage respectively. An isolate named S3 was identified as *Paenibacillus* genus on the basis of physiological and biochemical characterization, 16S rDNA sequencing, whole-cell fatty acid composition analysis and DNA-DNA hybridization. According to the phylogenetic tree constructed by 16S rDNA sequence, the phylogenetic distances of *Paenibacillus* like strains close to S3 were *P. curdolanolyticus*, *P. kobensis* and *Paenibacillus* sp. PALXIL08. The results of DNA-DNA hybridization showed that the homology of S3 and the three strains was 37.8%, 21.7% and 29.4%, respectively. Thus isolate S3 may represent a novel species of *Paenibacillus*.

**Key words:** *Paenibacillus*; 16S rRNA; DNA-DNA hybridization

目前,工业上生产糖化酶的微生物主要是一些真核微生物,真菌糖化酶通常存在一段氧化糖基化区域,该区域的正常氧化糖基化与糖化酶的稳定性和活性有很大的关系,原核生物一般不能准确糖基化来自真核生物的糖化酶,这使得原核宿主菌表达的真核生物糖化酶基因产物不稳定甚至完全没活性。而来自原核生物的糖化酶一般不存在氧化糖基化的区域,遗传操作更容易,成为糖化酶研究的新热点。本研究从富含淀粉的环境中筛选能产生糖化酶的细菌菌株进行研究,为最终构建能有效水解淀粉生产乙醇的运动发酵单胞

菌工程菌奠定基础。

在对分离到的菌种进行多相分类鉴定时,发现一株暂命名为 S3 的类芽孢杆菌菌株和现已经报道的类芽孢杆菌属各个种都存在较大的差异,难以将其归为其中的某一个种,疑似为类芽孢杆菌属一个新种,现将相关情况报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与培养基

#### 1.1.1 样品

采集成都周边甘薯地、下水道和面粉厂厂区富含有机质的土壤,共采样 12 份,采样深度 5~20 cm,每份土样约 100 g,取后迅速将土样置于无菌纸袋中,尽快送实验室分离可以水解淀粉的菌株。

#### 1.1.2 菌株

收稿日期:2019-03-07

基金项目:四川省教育厅自然科学重点项目(18ZA0001);阿坝师范学院校级专项课题(ASZ17-01)

作者简介:李 懿(1981-),男,助理研究员,硕士,主要从事资源与环境微生物方面的研究。

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 $\alpha$ 为本实验室保存,用于DNA片段的克隆。*P. curdolanolyticus* DSM 10247和*P. Kobensis* DSM 10249由日本三井农林株式会社后藤庆一博士惠赠。*Paenibacillus* sp. PALXIL08由西班牙萨拉曼卡大学Prof. Encarna Velazquez惠赠。

### 1.1.3 培养基

#### 1.1.3.1 分离用选择性培养基(g/L)

生甘薯淀粉 10, NaNO<sub>3</sub> 1.5, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, NaCl 2, 锥虫蓝 0.05, 用 2 mol/L NaOH 调 pH 到 7.0, 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min; 固体培养基为相应的液体培养基加 1.5% 琼脂粉。锥虫蓝可以指示淀粉的水解过程,随着淀粉的水解锥虫蓝由蓝色逐渐变为无色<sup>[1]</sup>。

#### 1.1.3.2 芽孢杆菌糖醇发酵培养基(g/L)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, KCl 0.2, 酵母膏 0.2, 糖或醇类 10.0, 2% 溴百里酚蓝 1 mL, 琼脂粉 6.0, 加入指示剂前调节 pH 至 7.0, 分装试管, 每管 4.5 mL。115 °C 30 min 灭菌, 不耐高温的糖醇要配成 10% 水溶液, 过滤灭菌后, 加入无菌培养基中。

#### 1.1.3.3 碳源利用基础培养基(g/L)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.5, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, 测定时分别加碳源到基础培养基中, 碳源浓度约在 0.1% ~ 1% 之间, 调 pH 至 7.2 左右, 分装试管, 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

#### 1.1.3.4 氮源利用基础培养基(g/L)

葡萄糖 10.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.13, CaCl<sub>2</sub> 0.1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.36, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 测定时分别加硝态氮或铵态氮到基础培养基中, 氮源浓度在 0.05% ~ 0.1% 之间, 调 pH 至 7.2 左右, 分装试管, 115 °C 高压蒸汽灭菌 30 min。

### 1.1.4 质粒与工具酶

研究中所用质粒载体 pMD18-T 是一种高效克隆 PCR 产物(TA Cloning)的专用载体, 购自大连宝生物公司。分子克隆工具酶均购自大连宝生物工程公司, DNA 胶回收试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒为杭州 V-Gene 生物科技有限公司提供。

## 1.2 方法

### 1.2.1 酶解产物的测定

糖化酶水解淀粉的主要产物是葡萄糖, 通过纸层析检测<sup>[2]</sup>是否有葡萄糖的产生, 能初步区分水解淀粉的酶是糖化酶还是淀粉酶。以 0.1% 葡

萄糖溶液为对照品, 用正丁醇-乙酸-水(4:1:5 上层)作展开剂, 新配制的氨化硝酸银溶液为显色剂, 结果还原糖形成黑色斑点。

### 1.2.2 细菌表型及生理生化特征鉴定

细菌的菌落形态, 细胞运动参考周德庆等<sup>[3]</sup>的方法; 革兰氏染色和芽孢染色参考刘丽等<sup>[4]</sup>的方法。

细菌的 PH 适应情况、温度适应情况、需氧情况、碳源利用情况、氮源利用情况、耐盐性、抗药性、MR 实验、VP 实验、产吡啶实验、产 H<sub>2</sub>S 实验、糖醇发酵实验、水解淀粉实验、还原硝酸盐实验、水解酪素实验、明胶液化实验、石蕊牛奶反应、氨基酸脱氨反应、氨基酸脱羧反应和精氨酸双水解反应等生理生化实验参考东秀珠, 张晶等<sup>[5-7]</sup>的方法。

### 1.2.3 菌株的遗传特征鉴定

#### 1.2.3.1 16S rDNA 序列分析

PCR 引物采用细菌 16S rDNA 通用引物 f27 和 r1492<sup>[8]</sup>。上游引物 f27 : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 下游引物 r1492 : 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 35 次, 72 °C 延伸 10 min。DNA 测序工作由华大生物技术有限公司完成, 序列的拼接及相似性分析使用 NCBI 网站提供的 BLAST 功能与 Genbank 中的已知序列进行比对。系统发育树状图使用 DNAMAN 6.0 构建。

#### 1.2.3.2 基因组 G+C mol% 测定

细菌 DNA G+C mol% 的测定采用热变性温度法(T<sub>m</sub>), 参照菌株为大肠杆菌(*E. coli* K12)<sup>[9-10]</sup>。实验菌株的 G+C mol% 值在 0.1×SSC 溶液中计算公式为: G+C mol% = 51.2 + 2.08 × (T<sub>m</sub> 未知菌 - T<sub>m</sub> 大肠杆菌)。

#### 1.2.3.3 DNA 同源性分析

参考焦振泉等<sup>[11]</sup>的方法。

### 1.2.4 全细胞脂肪酸分析

将待检菌株接种于 TSBA (Trypticase Soy Broth Agar) 固体培养基上, 28 °C 培养 24 h, 收集菌体备用。提取脂肪酸采用 Komagata 和 Suzuki 等的方法<sup>[12]</sup>, 相关样品送中国科学院成都分院有机所作气质联用分析。

## 2 实验结果

### 2.1 产糖化酶细菌的筛选

把采集到的 12 份土壤样品按照梯度稀释涂板法处理后, 取 100  $\mu$ L 涂布于含锥虫蓝的分离用

选择性甘薯淀粉培养基平板上,于30℃温箱中培养1~2 d。挑取淀粉水解圈直径大于1 cm的细菌单菌落纯化保存。将分离得到的各菌株用液体选择性培养基(无锥虫兰)培养2 d后,取培养液做纸层析分析,获一株能水解淀粉产生葡萄糖的菌株,暂将其命名为菌株S3。

## 2.2 分离菌株的鉴定

### 2.2.1 形态特征

菌株S3在TSB平板上形成白色微黄圆形菌落,边缘不太整齐,菌落直径1~2 cm。用油镜观察,菌体成细长杆状,末端膨大生芽孢,芽孢体呈椭圆形;菌株S3革兰氏染色结果为革兰氏变性;通过半固体琼脂穿刺,菌株S3表现为可运动,即菌株S3应具有鞭毛。

### 2.2.2 生理生化特征

#### 2.2.2.1 生理特征

菌株S3的最适生长温度为30~35℃,在42℃以上和4℃下培养不能生长。菌株S3表现为兼性厌氧。菌株S3不能在pH 5.7的培养基中生长,其生长的最适pH为7.0左右。耐盐性和渗透压方面,菌株S3可以在2%浓度的NaCl中生长,但不能生长于5%浓度的NaCl。

#### 2.2.2.2 生化特征

(1)碳源利用情况:测定了S3对27种不同碳源的利用情况,包括3种多糖(淀粉、木聚糖、CMC),12种单糖和寡聚糖(葡萄糖、果糖、半乳糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、鼠李糖、密二糖、棉籽糖),5种醇类(乙醇、正丁醇、甘油、山梨醇、甘露醇),5种有机酸盐(柠檬酸盐、丙酸盐、葡萄糖酸盐、丁二酸盐、醋酸盐)以及乙酰胺和七叶苷。实验结果表明,菌株S3可以利用其中3种多糖,12种单糖和寡聚糖,以及甘油、山梨醇、葡萄糖酸盐、乙酰胺、七叶苷20种碳源、不能利用乙醇、正丁醇、甘露醇、柠檬酸盐、丙酸盐、丁二酸盐和醋酸盐7种碳源。

(2)氮源利用情况:用NH<sub>4</sub>Cl, NaNO<sub>3</sub>测定铵态氮和硝态氮的利用情况,结果表明菌株S3既能利用铵态氮也能利用硝态氮。

(3)糖醇发酵实验:菌株S3可以发酵葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、乳糖、半乳糖、密二糖等糖类产酸。

(4)其他生化实验:菌株S3的氧化酶实验结果为阳性,也可产生触酶、尿素酶。S3能还原硝酸盐为亚硝酸盐。S3不能产生吡啶,不能产生吡啶是类芽孢杆菌属菌种的一个共同特点。S3不

能产H<sub>2</sub>S。MR实验及VP实验方面,菌株S3的测试结果都显示为阴性,说明S3不能发酵葡萄糖大量产酸,它的产酸能力有限,同时S3也不能大量将发酵葡萄糖所产的酸转化为类似乙酰甲基甲醇之类的物质。菌株S3能水解淀粉,它水解淀粉的产物之一是糊精。酪素水解实验中未观察到水解圈,说明S3不产生胞外蛋白酶。石蕊牛奶反应表明S3菌株可以发酵乳糖产酸。明胶液化实验证明菌株S3不能产生明胶酶。此外,氨基酸脱氨反应、氨基酸脱羧反应、精氨酸双水解反应都为阴性。也就是说菌株S3不能产生苯丙氨酸脱氨酶、赖氨酸脱羧酶及精氨酸水解酶。

### 2.2.3 菌株遗传特征

#### 2.2.3.1 16S rDNA的序列测定

通过PCR获得一条大小约为1 400 bp的片段,将PCR反应所获得的16S rDNA序列进行TA克隆,转化大肠杆菌,挑选出重组子,经琼脂糖凝胶电泳分析,筛选出所需重组质粒。将重组质粒送至华大生物科技有限公司测序,根据测序结果,得到一条1 474 bp长的核苷酸序列(图1)。

```

1  gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtogagc ggaacttgaag gagtctctgc
61  actctctgatg gttagcggcg gacgggtgag taacacgtag gcaacctgcc cgtaaagactg
121  gataaacatt cggaaacgaa tgctaatacc ggaacgcga ttttctgca tgagggaatc
181  gggaaagaag gagcaacttt tcaactacgg atggcgctgc ggcgcattag ctatgtggtg
241  ggttaacggc ccaccaaggc gacgatgcgt agccgacctg agagggtgat cggccacct
301  gggactgaga cagggccag actcctacgg gaggcagcag tagggaaatct tccgcaatgg
361  acgaaagtct gacggagcaa cgcgcgctga gtagaaggc ctttcgggtc gtaaacgctct
421  gttgcccagg aagaacactt gagagatgaa ctgctcttga gatgacggta cctgagaaga
481  aagcccggcg taactacgtg ccagcagccg gcttaatacg tagggggcga cggctgtccg
541  gaattattgg gcgtaaacgc cgcgcaggcg gctttgtaag tctgtcgttt aagttcgggg
601  ctcaatcccg tctcggatg gaaactgcaa gcttgagta cagaagaggga aagtggaatt
661  ccacgtgtag cggtaaatg cgtagagatg tggaggaaac ccagtgccga agggcacttt
721  ctgagctgta actgacgtg agggccgaaa gctggggag caaacaggat tagataccct
781  gtagtccac gccgtaaacg atgaaatgca ggtttagggg gtttcaaac ccttggtgcc
841  gaagttaaca cattaagcat tccgcctggg gtagcgtct gcaagagtg aactcaaaag
901  aattgacggg gaccgcaca agcagtgag tatgtggttt aattcgaagc aacgcgaaga
961  accttaccag gctttgacat ccctctgacc ggttggaga caggccttcc cttcggggca
1021  gaggagacag gtggtgatg gttgtcga gctcgtctg tgagatgtg ggttaagtcc
1081  cgaacggagc gcaaccttg attttagtt cagcacttt aggtgggac tctagaatga
1141  ctgcccgtga caaacggag gaagcgggg atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgac
1201  ctgggctaca cacgtactgc aatggccgct acaacggcct gcgaaaga gc gatcggagc
1261  gaatcctata aagccggtct cagttcggat tgcaggtctc aactcgcctg catgaagtgc
1321  gaattgctag taatcgggca tcagcatgcc gggtagata cgttccggg tctttgacac
1381  accgcccgtc acaccacgag agtttacaac accggaagcc ggtggggtaa ccgcaaggag
1441  ccagccctgc aagtggggt agatgattgg ggtg

```

图1 菌株S3的16S rDNA核苷酸序列

#### 2.2.3.2 G+C mol%的测定

经测定,菌株S3的G+C mol%值约为51.2%。

#### 2.2.3.3 DNA-DNA同源性比较

菌株S3与*P. curdianolyticus* DSM 10247的DNA同源性为37.8%,与*P. kobensis* DSM 10249的DNA同源性为21.7%,与*Paenibacillus* sp. PALXIL08的DNA同源性为29.4%。

#### 2.2.4 全细胞脂肪酸成分分析

收集培养的菌株S3的菌体,提取全细胞脂肪

酸后送交中国科学院成都分院有机所做气质联用分析。分析结果和其他几种 16S rDNA 序列最相近的类芽孢杆菌的全细胞脂肪酸成分进行比较,结果见表 1。

表 1 菌株 S3 和参比菌株的全细胞脂肪酸成分比较

脂肪酸类型	1	2	3	4	5
%					
饱和直链脂肪酸					
C14:0	2.5	0.8	1.3	1.2	1.8
C15:0	0.9	0.4	ND	0.9	ND
C16:0	11.7	0.6	7.4	16.1	11.8
C17:0	5.4	9.9	0.4	0.2	0.6
饱和异式脂肪酸					
C14:0	2.9	1.8	3.0	2.3	2.2
C15:0	5.2	5.4	3.3	6.1	9.9
C16:0	14.1	15.4	28.8	14.5	11.1
C17:0	ND	16.4	1.6	5.2	3.3
饱和反式脂肪酸					
C15:0	50.6	44.6	44.1	38.5	48.6
C17:0	2.1	4.7	8.3	14.0	6.4
不饱和脂肪酸					
C16:1 $\omega$ 7C	ND	ND	0.5	ND	1.9
C18:1 $\omega$ 9C	1.8	ND	ND	ND	ND

注: 1: Strain S3<sup>T</sup>; 2: *P. curdlanolyticus* DSM 10247<sup>T</sup>; 3: *P. cellulolyticus* LMG 22232<sup>T</sup>; 4: *P. kobensis* DSM 10249<sup>T</sup>; 5: *P. phylosphaerae* LMG 22192<sup>T</sup>[13-16]; ND: 未检出

### 3 分析与讨论

#### 3.1 16S rDNA 测序结果分析

使用 NCBI 网站提供的 BLAST 功能,对菌株 S3 的 16S rDNA 序列进行核酸序列比对,发现菌株 S3 的 16S rDNA 序列与类芽孢杆菌属多个种的 16S rDNA 序列近似,而与其他属菌种的 16S rDNA 序列相差较大。菌株 S3 的 16S rDNA 序列与 *P. curdlanolyticus* DSM 10247<sup>[13-14]</sup> 的 16S rDNA 序列 98.1% 同源,与 *Paenibacillus* sp. PALXIL08<sup>[15]</sup> 的 16S rDNA 序列 97.2% 同源,与 *P. kobensis* DSM 10249<sup>[13-14]</sup> 的 16S rDNA 序列 97.1% 同源。由此,可以初步判断菌株 S3 属于类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)。

基于菌株 S3 的 16S rDNA 全序列和从 GenBank 中下载的相关类芽孢杆菌属的 16S rDNA 序列,用邻近法 (neighbour joining) 构建系统发育树<sup>[17-18]</sup>,用自展法 (bootstrap) 检验系统发育树的可靠性,自展 1 000 次。用 ClustalX 进行 16S rDNA 序列的比对 (alignment)<sup>[19]</sup>,用 DNAMAN 6.0 进行相关进化树的构建和调整,最终得到 S3 的 16S rDNA 序列的系统进化树 (图 2)。从图 2 可以看到, *Paeni-*

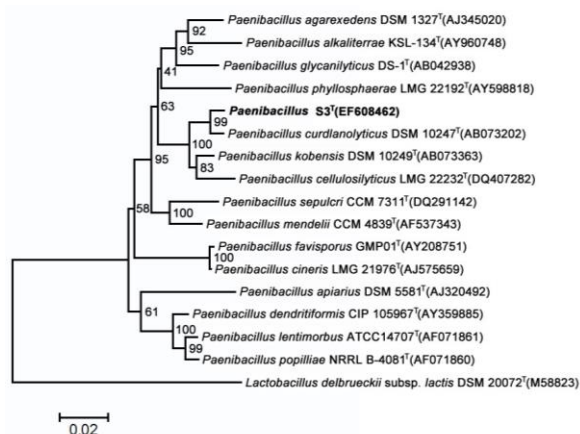


图 2 菌株 S3 的进化树

*bacillus* sp. S3 与 *P. curdlanolyticus* DSM 10247 进化关系最近,其次是 *P. kobensis* DSM 10249 和 *Paenibacillus* sp. PALXIL08。一般认为 16S rDNA 序列同源性不足 97% 的两菌株肯定不是同一菌种,而在两菌株 16S rDNA 序列同源性高于 97% 的情况,则需要其他的生化和分子鉴定实验来鉴定两菌株是否为同一个种。因此根据 S3 的 16S rDNA 序列的比对结果和它的系统进化树显示的结果,需要对 *Paenibacillus* sp. S3 做进一步的生理生化和分子水平的鉴定实验,并将实验结果与 *P. curdlanolyticus* DSM 10247、*P. kobensis* DSM 10249 和 *Paenibacillus* sp. PALXIL08 已经报道的同类特征做比较,以确认它们是否为不同的种。

#### 3.2 G+C mol% 结果分析

根据报道,*P. curdlanolyticus* DSM 10247 的 G+C mol% 值为 51.7%, *P. kobensis* DSM 10249 的 G+C mol% 值为 51.1%, *Paenibacillus* sp. PALXIL08 的 G+C mol% 值为 51.0%。类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 的 G+C mol% 值在 39% ~ 54% 范围之内,菌株 S3 的 G+C mol% 值为 51.2% 也在这个范围之内,但因为菌株 S3 的 G+C mol% 值和 *P. curdlanolyticus* DSM 10247, *P. kobensis* DSM 10249、*Paenibacillus* sp. PALXIL08 的 G+C mol% 值差别很小,不能以此判断它们是否为不同的种。

#### 3.3 DNA-DNA 杂交结果分析

DNA-DNA 杂交最适合细菌种水平的鉴定,一般认为在最适复性条件下, DNA 同源性在 70% 以上属于同一个种。在 20% 以上可能属于同一个属。根据实验结果,菌株 S3 和 *P. curdlanolyticus* DSM 10247、*P. kobensis* DSM 10249 与 *Paenibacillus* sp. PALXIL08 的 DNA 同源性都低于 40%,且高于 20%,应该是同属不同种的菌株。但是由于常规用于基因组杂交实验的各种方法都存在一定误

差,因此简单地根据 DNA-DNA 杂交水平划分种和属是不可取的,因此还需要其他特征的佐证。

### 3.4 生理生化实验结果分析

从表 2 中可以看到,在一些关键的生理生化特征氧化酶、尿素酶、硝酸盐还原反应、VP 值及多糖利用等方面,S3 与 4 种参比菌都存在差别,与 S3 16S rDNA 序列有 98.1% 同源的 *P. curdlanolyticus* 和 S3 间存在 9 种生理生化特征的差别;S3 与 *P. kobensis* DSM 10249 间存在 11 个特征的差异;与 *P. cellulosityticus* LMG 22232 也存在 8 个特征的差异。S3 与 *P. phyllosphaerae* LMG 22192 虽然只发现 6 个不同的生理生化特征,但它们的 16S rDNA 序列同源性远不足 97%。

表 2 菌株 S3 和参比菌株各种生理生化特征的主要区别

测试项目	1	2	3	4	5
氧化酶	+	-	-	+	+
尿素酶	+	+	+	-	-
VP 试验	-	-	-	+	-
硝酸盐还原作用	+	+	+	-	+
VP 试验培养基	5.9~	5.3~	5.3~	6.5	5.3
pH 值	6.0	5.4	5.4		
CMC 降解	+	-	-	+	+
木聚糖降解	+	Nd	Nd	+	+
L-阿拉伯糖产酸	-	+	+	Nd	Nd
棉子糖产酸	+	+	-	Nd	Nd
半乳糖同化	+	-	-	Nd	+
D-甘露糖同化	w	-	-	+	w
鼠李糖同化	w	-	-	+	w
N-乙酰氨基葡萄糖同化	+	+	+	-	-
甘油同化	+	+	-	Nd	+
甘露醇同化	-	-	-	-	+
水杨酸同化	-	+	+	Nd	+
山梨醇同化	w	-	-	-	-

注: 1: Strain S3<sup>T</sup>; 2: *P. curdlanolyticus* DSM 10247<sup>T</sup>; 3: *P. kobensis* DSM 10249<sup>T</sup>; 4: *P. cellulosityticus* LMG 22232<sup>T</sup>; 5: *P. phyllosphaerae* LMG 22192<sup>T[13-16]</sup>; +: 阳性; -: 阴性; V: 可变; w: 弱; Nd: 无可用数据

### 3.5 全细胞脂肪酸成分实验结果分析

从表 1 可以看出,菌株 S3 的全细胞脂肪酸主要成分是反异式 15 碳饱和脂肪酸,含量为 50.6%,其次是异式 16 碳饱和脂肪酸为 14.1%,然后是 16 碳饱和直链脂肪酸为 11.7%,这些特征与类芽孢杆菌的特征最相似。

S3 的全细胞脂肪酸的成分符合类芽孢杆菌的特征,但是和相比的其他几种菌都存在较大的区别,比如说饱和直链 16 碳脂肪酸在 S3 全细胞脂

肪酸中所占的比重为 11.7%,但在 *P. curdlanolyticus* DSM 10247 中只占 0.6%;饱和直链 17 碳脂肪酸在 S3 全细胞脂肪酸中所占的比重为 5.4%,但在 *P. cellulosityticus* LMG 22232 中只占 0.4%,在 *P. kobensis* DSM 10249 中只占 0.2%,在 *P. phyllosphaerae* LMG 22192 中也只占 0.6%;饱和异式 16 碳脂肪酸在 S3 全细胞脂肪酸中所占的比重为 14.1%,但在 *P. cellulosityticus* LMG 22232 中所占的比重却高达 28.8%;饱和反异式 15 碳脂肪酸在 S3 全细胞脂肪酸中所占的比重为 50.6%,但在 *P. kobensis* DSM 10249 中所占的比重只有 38.5%;在 S3 全细胞脂肪酸中所占比重为 2.1% 饱和反异式 17 碳脂肪酸在 *P. cellulosityticus* LMG 22232 中占 8.3%,在 *P. kobensis* DSM 10249 占 14.0%;在 S3 全细胞脂肪酸中未检测到的饱和异式 17 碳脂肪酸在 *P. curdlanolyticus* DSM 10247 中占 16.4%,在 *P. kobensis* DSM 10249 占 5.2%。全细胞脂肪酸成分的差异进一步证明了 S3 可能不属于参加比较的任何一个菌种。

## 4 结论与展望

因为芽孢杆菌菌群十分庞大,目前对于芽孢杆菌的分类不能只靠单一的表型或仅依据其基因型进行单相分类,而必须采用对表型、基因型和系统发育信息进行综合评价的多相分类法。根据 16S rDNA 鉴定结果,菌株 S3 和 *P. curdlanolyticus* DSM 10247, *Paenibacillus* sp. PALXIL08 及 *P. kobensis* DSM 10249 有较近亲缘关系,但是从生理生化实验、DNA-DNA 杂交实验和全细胞脂肪酸成分分析实验的结果看,菌株 S3 和上述 3 种类芽孢杆菌之间差异较大,难以将 S3 划归已公布的任何一个种,因此,认为菌株 S3 是类芽孢杆菌属的一个新种。目前菌株 S3 已经被 CICC 和 CCTCC 保存 (CCTCC AB 208089, CICC10358)。

现已报道的产糖化酶的细菌有 40 余种。主要为嗜热古细菌、耐热厌氧菌和兼性厌氧菌。其中厌氧梭菌生产的糖化酶是研究最广泛的细菌糖化酶,几种厌氧梭菌糖化酶的蛋白序列有高度同源性。Gill R K 等 2004 年报道了一种嗜热芽孢杆菌能产生糖化酶<sup>[20]</sup>,但类芽孢杆菌中还没有糖化酶产生菌的报道,对 S3 产生的糖化酶的酶学性质进行了初步研究,具体结果将另文报道。近些年有多个类芽孢杆菌属新种的报道,它们中许多种类存在丰富的多糖水解酶系,能水解纤维素、木聚糖和淀粉等多种多糖,但目前没有对这些多糖水解酶系的酶学性质和遗传背景做深入研究。本

研究筛选并鉴定的 *Paenibacillus* sp. S3 也存在丰富的多糖水解酶系,除能利用淀粉外还可以水解纤维素和木聚糖等多糖,*Paenibacillus* sp. S3 存在的纤维素酶,木聚糖酶也有进一步研究的价值。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 马向东,马立新.一种鉴定 $\alpha$ -淀粉酶活性及其产生菌的新方法[J].华中农业大学学报,2000,19(5):456-460.
- [ 2 ] 李建武.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994:125-131.
- [ 3 ] 周德庆,徐德强.微生物学实验教程(第3版)[M].北京:高等教育出版社,2013:16-23.
- [ 4 ] 刘 丽,张艳菊.蚯蚓粪中黄瓜枯萎病菌拮抗细菌的筛选及鉴定[J].东北农业科学,2016,41(3):57-61.
- [ 5 ] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:364-399.
- [ 6 ] 张 晶,徐宏伟,曾国航,等.米氏硫酸素芽孢杆菌的分离及鉴定[J].新疆农业科学,2016,53(1):59-67.
- [ 7 ] 赵文龙,王 龙,张永红,等.一株抗逆性凝结芽孢杆菌的分离与鉴定[J].北京农学院学报,2014,29(2):36-39.
- [ 8 ] Kim S B, Yoon J H, Kim H, et al. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomonospora* conducted with 16S rRNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(2): 351-356.
- [ 9 ] De Ley J. Reexamination of the association between melting point, buoyant density, and chemical base composition of deoxyribonucleic acid[J]. Journal of Bacteriology, 1970, 101(3): 738-754.
- [ 10 ] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms[J]. Journal of molecular biology, 1961, 3(2): 208-211.
- [ 11 ] 焦振泉,刘秀梅,杨瑞馥,等.微孔板杂交法测定椰毒假单胞酵米面亚种的DNA-DNA同源性[J].微生物学报,2001,41(1):70-75.
- [ 12 ] Komagata K, Suzuki K I. 4 Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics[J]. Methods in Microbiology, 1988, 19: 161-207.
- [ 13 ] Kanzawa Y, Harada A, Takeuchi M, et al. *Bacillus curdlanolyticus* sp. nov. and *Bacillus kobensis* sp. nov., which hydrolyze resistant curdlan[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1995, 45(3): 515-521.
- [ 14 ] Shida O, Takagi H, Kadowaki K, et al. Transfer of *Bacillus algino-lyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1997, 47(2): 289-298.
- [ 15 ] Rivas R, Mateos P F, Martínez-Molina E, et al. *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera*[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2005, 55(2): 743-746.
- [ 16 ] Rivas R, García-Fraile P, Mateos P F, et al. *Paenibacillus cellulolyticus* sp. nov., a cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from the bract phyllosphere of *Phoenix dactylifera*[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2006, 56(12): 2777-2781.
- [ 17 ] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of molecular evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [ 18 ] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular biology and evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [ 19 ] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic acids research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [ 20 ] Gill R K, Kaur J. A thermostable glucoamylase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and thermostability[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2004, 31(11): 540-543.

(责任编辑:刘洪霞)