

一株耐高温抑菌黏质沙雷氏菌的鉴定及其红色素的初步分离

赵银娟¹, 薛斌², 李桂娥¹, 吴小扁¹

(1. 南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏省有害生物入侵与控制重点实验室, 江苏南京 210037; 2. 南京大学医学院, 江苏南京 210037)

摘要 [目的]为了了解黏质沙雷氏菌的抑菌机理及温度对其产生色素的影响。[方法]从土壤中分离纯化得到1株产红色素细菌, 对该菌进行生理生化和16S rDNA鉴定, 同时对该菌产生的红色素进行了初步的探讨。[结果]该菌为黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*), 在28℃条件下培养红色素产量最高, 37℃下仍能产生色素, 说明该菌株是耐高温红色素产生菌。紫外全波长扫描分析和薄板层析结果表明, 其红色色素有可能是灵菌红素。[结论]该菌对霉状杆菌和镰刀菌等病原菌具有一定的抑制作用。

关键词 红色素; 黏质沙雷氏菌; 鉴定

中图分类号 S182; Q93 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)07-02829-03

Identification of Thermo-stability *Serratia marcescens* Strain Inhibiting Bacterial and Preliminary Isolation of Red Pigment

ZHAO Yin-juan et al (Jiangsu Key Laboratory for Prevention and Management of *Serratia marcescens* on Invasion Species, College of Forestry Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037)

Abstract [Objective] The research aimed to study the antibacterial mechanism of *Serratia marcescens* and the effects of the temperature on the production of the red pigment. [Method] A bacterial strain producing red pigment was isolated from soil, and its morphology, biochemical, physiological characteristics and 16S rDNA sequence were investigated. [Result] The strain was identified as *Serratia marcescens*. The red pigment was extracted by ethyl alcohol. The maximum production was obtained at 28℃, still, a little pigment were synthesized at 37℃. This result indicated that the strain was temperature-stability. The results of ultraviolet full wavelength scanning analysis and sheet chromatography showed that the red pigment might be prodigiosin. [Conclusion] *Serratia marcescens* could inhibit bacterial such as fusarium and bacillus cereus mycoides.

Key words Red pigment; *Serratia marcescens*; Identification

黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)是一类革兰氏阴性细菌, 属肠杆菌科, 对人、植物和昆虫都是条件致病菌。在生长过程中会产生一种次生代谢产物——灵菌红素^[1]。有文献报道, 黏质沙雷氏菌对昆虫具有一定的感染性, 可在生物防治中发挥作用。近期研究表明, 灵菌红素具有免疫抑制、抗真菌、抗增殖作用, 并且能够诱导某些癌症细胞的程序性凋亡, 很可能在医药工业中具有潜在的应用价值^[2-4]。因此, 对黏质沙雷氏菌的研究已越来越受到人们的重视。而黏质沙雷氏菌有一个突出的特点, 就是其产生色素的能力受温度的影响非常大, 在25℃左右时能够产生红色色素, 而一旦温度升高, 尤其达到37℃时, 红色色素即不再生成^[5-6]。温度是影响黏质沙雷氏菌生理代谢过程的重要的环境因子^[7-8]。该研究发现这株菌在抑制霉菌和细菌方面均有一定的效果。采用biolog全自动鉴定仪及16S rDNA序列分析等手段, 鉴定该菌为黏质沙雷氏菌。它在较高温度如35℃左右仍有较好的产生色素的能力。这与一般的黏质沙雷氏菌不同。为了了解该菌的抑菌机理及温度对其产生色素的影响, 笔者进一步分离了该菌产生的色素, 初步鉴定为灵菌红素。

1 材料与方 法

1.1 产红色素细菌的分离 取1g土样, 加入100ml灭菌蒸馏水, 稀释100倍, 取200μl涂布于LB固体培养基(胰蛋白胨1%、酵母提取物1%、NaCl 1%、琼脂粉1.7%、pH7.0~7.5), 28℃培养3d, 分离产红色素单菌落, 得纯培养物。

1.2 细菌鉴定

1.2.1 生理生化鉴定。根据分离菌的菌落和菌体形态, 芽孢的有无和着生情况, 革兰氏染色以及生理生化反应, 按biolog全自动细菌鉴定仪进行生理生化鉴定。选用GENEIII鉴定板, 于28℃培养, 连续观察48h。

1.2.2 16S rDNA的扩增与序列分析。将菌种分别接种于20、150ml种子培养基, 37℃、180r/min培养12h。提取基因组DNA, 以此为模板, 扩增该菌16S rDNA序列。PCR引物采用27F和1492R通用引物, 以提出的分离菌DNA做模板, 引物由上海美吉生物有限公司合成, 预计扩增片段1.5kbp左右。引物序列: 反向序列(1492R): GGTACCTTGT-TACGACTT, 正向序列(27F): AGAGTTTGATCCTGGCTCAG。PCR反应试剂均采购于北京艾比根生物有限公司。PCR反应体系为: 10×扩增缓冲溶液, 5μl; 5U/μl的Taq DNA聚合酶, 0.5μl; 25mmol/L的dNTP, 1μl; 20μmol/L的引物, 2μl; 模板DNA, 2μl; 双蒸水, 39.5μl; 反应总体积50μl。PCR反应条件为: 预变性95℃2min, 变性95℃30s, 退火53℃30s, 延伸72℃45s, 32个循环, 72℃修复7min。

1.2.3 系统发育分析。将菌株16S rDNA测序结果采用Blasting程序, 与GenBank核酸数据中进行比对分析。选择合适的序列, 进行分子遗传学鉴定, 并构建系统发育树。

1.3 红色素的提取 从菌种斜面挑取1环培养物, 接种于液体培养基, 28℃、180r/min振荡培养12h。以此为种子液, 按200μl/平皿接种量涂布均匀, 28℃培养36h。用药匙刮下红色菌苔, 置于无水乙醇(20ml/平皿)中浸提色素, 充分振荡后, 4℃静置8h, 弃菌泥, 过滤色素浸提液, 70℃旋转蒸发, 浓缩得深紫红色素乙醇浓溶液。

1.4 红色素的光谱特征 对色素乙醇溶液作20~800nm

基金项目 国家自然科学基金青年基金(31100448); 博士点基金(21132-04120004); 江苏高校优势学科建设工程资助项目。

作者简介 赵银娟(1979-), 女, 江苏武进人, 讲师, 博士, 从事微生物学的教学与研究工作, E-mail: zhaoyinjuan@hotmail.com。

收稿日期 2013-03-11

全波长扫描,得吸收光谱图,确定色素特征吸收峰值。

1.5 红色素的薄板层析分析 选用 GF250 硅胶粉,按硅胶:溶液 1.0:2.5 比例配制成薄板,115 ℃ 活化 1 h。展层剂为 V(二氯甲烷):V(乙酸乙酯) = 5:1。

1.6 抑菌活性分析 参照文献[9],采用平板对峙方法,观察菌株抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 产红色素菌株的鉴定

2.1.1 形态特征。在试验过程中发现一株具有较好抑制其

他微生物的产红色素菌株,划线分离、纯化后得到较纯的一株,命名为 NJZT-1。该菌在 LB 平板上的菌落朱红色,呈圆形,边缘整齐,湿润有黏性,不透明。表面隆起,光滑黏稠,易挑取,有轻微异味。光学显微镜下观察,革兰氏阴性,大小 $0.5 \mu\text{m} \times (0.5 \mu\text{m} \sim 1.0 \mu\text{m})$,短杆状,成单或成短链排列。无芽孢,无鞭毛。

2.1.2 生理生化特征。NJZT-1 菌株的生理生化培养特性通过 biolog 全自动鉴定仪测定,测试结果显示为黏质沙雷氏菌,结果见图 1。

Species ID: *Serratia marcescens* ss *marcescens*

	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
==>1	0.902	0.589	6.138	GN-ENT	<i>Serratia marcescens</i> ss <i>marcescens</i>
2	0.065	0.040	7.089	GN-ENT	<i>Serratia liquefaciens</i> /grimesii
3	0.029	0.017	7.377	GN-ENT	<i>Serratia proteamaculans</i>
4	0.005	0.003	8.022	GN-ENT	<i>Serratia odorifera</i>

图 1 NJZT-1 菌株的 biolog 鉴定结果

2.1.3 分子生物学鉴定及其系统发育树。提取 NJZT-1 的基因组 DNA,以此为模板,采用 16S rDNA 特异引物对其作 PCR,得到约 1.5 kb 的单一扩增产物。序列测定表明,扩增产物长 1 499 bp,具有典型的 16S rDNA 特征。上传至 genbank,获序列号为 JX217822。采用 Blasting,将该序列与 GenBank 的核酸数据作同源性比对。结果表明,提交序列与已知黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*) 16S rDNA 的序列同源性达到 99% 以上。然后,将 NJZT-1 菌株的 16S rDNA 基因序列与 GenBank 数据库中已知的沙雷氏菌属内近缘菌株进行多序列比较后,用 MEGA4 以 Neighbor-Joining 法绘制系统发育树(图 2)。它与黏质沙雷氏菌菌株的同源性最高。结合形态特征和生理生化特征,最终鉴定该 NJZT-1 菌株属于沙雷氏菌属的黏质沙雷氏菌。

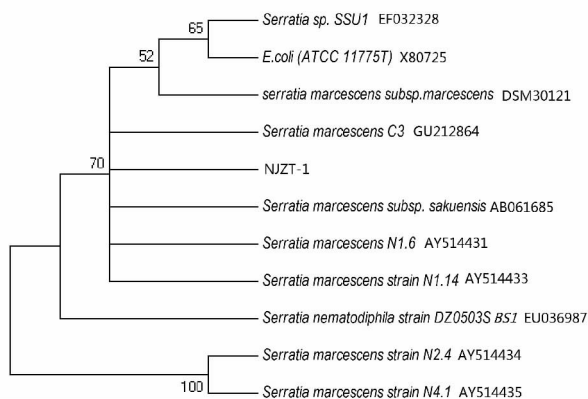
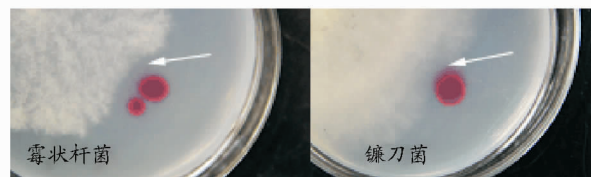


图 2 基于 16S rDNA 序列建立的菌株 NJZT-1 的系统发育进化树

2.2 NJZT-1 菌株的抑菌活性 采用平板对峙方法,挑取 NJZT-1 菌,分别和霉状杆菌、镰刀菌、交链孢等土壤病原菌置于 LB 平板上,于 28 ℃ 培养,观察其抑制情况。由图 3 可知,

NJZT-1 菌株对霉状杆菌和镰刀菌具有一定的抑制作用,对霉状杆菌的抑制作用尤其明显。



注:图中箭头所指处为抑菌圈。

图 3 NJZT-1 菌株对霉状杆菌和镰刀菌的平板对峙结果

2.3 不同温度对 NJZT-1 菌株产红色素的影响 在 LB 平板上分别接种 NJZT-1 菌株及另 2 种已知的黏质沙雷氏菌,分别在 20、25、30、35、37 ℃ 下培养,观察它在不同温度下产色素的能力。由图 4 可知,该菌在较高温度 35 ℃ 下都有很好的产色素能力,而普通黏质沙雷氏菌在 35 ℃ 时产红色素的能力开始减弱。

2.4 菌株产色素的分析

2.4.1 紫外吸收光谱分析。NJZT-1 菌株产色素的紫外可见光吸收光谱见图 5。以无水乙醇作为浸提液所得色素在 535 nm 处有明显的吸收峰,从相关资料已知灵菌红素的吸收峰为 535 nm,其分子结构中含有 3 个吡咯环^[10]。同时,该浸提液的全波长扫描还显示在 497 nm 处有一不规则的峰。这很有可能说明在该初提物中存在着与灵菌红素的类似物。

2.4.2 薄层色谱分析。研究表明,所选展开系统(V(二氯甲烷):V(乙酸乙酯) = 5:1)对 NJZT-1 菌株所产色素有较好的分离效果。在此展开系统下得到一红色清晰斑点,其比移值(R_f)在 0.50 左右(图 6)。

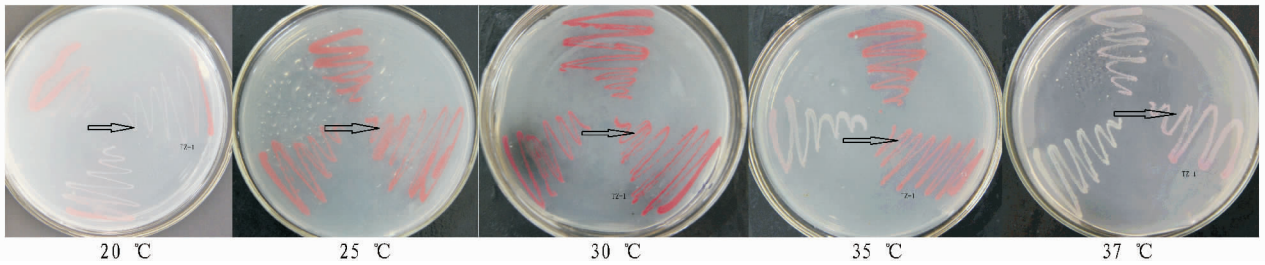


图4 NJZT-1 菌株在不同温度下的产色素能力

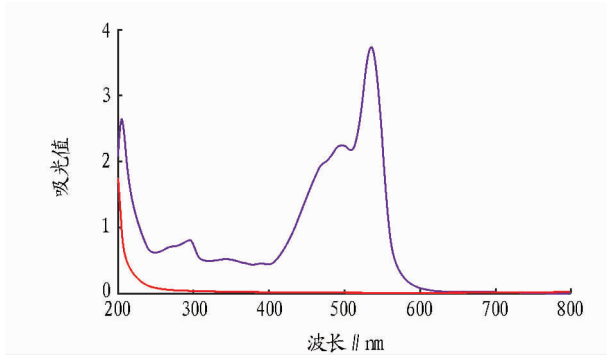


图5 红色素全波长扫描结果

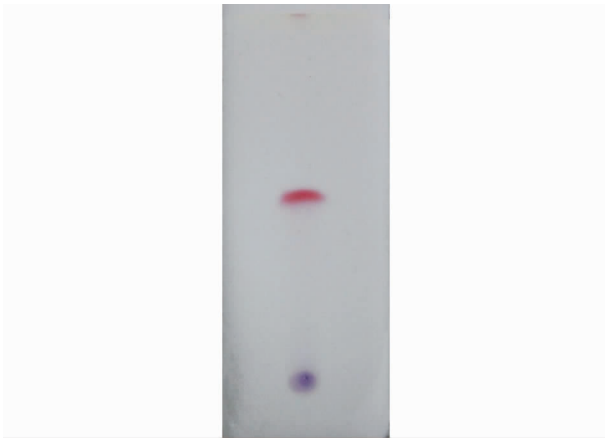


图6 红色素薄层色谱分析结果

3 结论与讨论

从土壤中筛选到一株能够产生红色素的菌株。该菌对霉状杆菌、镰刀菌等都具有一定的抑制作用。通过对常规的菌落外观特征、显微镜下特征和生理生化试验进行了初步鉴定,进一步通过 16S rDNA 序列分析得到它与黏质沙雷氏菌的同源性为 99.2%,最终鉴定该菌为黏质沙雷氏菌。该菌株的 16S rDNA 基因序列已在 GenBank 注册(JX217822)。

黏质沙雷氏菌是生产灵菌红素的主要菌株,温度是其产生灵菌红素的关键因素。一般,黏质沙雷氏菌在 25 °C 左右能够较好地产生这类色素,而温度升高尤其在 37 °C 时则不产生色素^[11]。该研究中 NJZT-1 菌株对温度的敏感性并没有

那么强烈,在较宽的温度范围(20 ~ 35 °C)内具有较好的产色素能力,且在 37 °C 时仍有色素产生。在平板对峙试验过程中发现,在不合适的温度下对峙结果没有最适温度下的理想。这说明对微生物具有抑制作用的物质不是沙雷氏菌本身,而是其所产生的红色色素。从初步的分离和鉴定结果来看,它很有可能是灵菌红素。该研究目前所得结果尚未精确到色素的具体组分。今后,将通过后续试验,分析色素不同的组分、结构及其抑菌效果。

参考文献

- [1] LEWIS S M, CORPE W A. Prodigiosin producing bacteria from marine sources[J]. *App Microbiol*, 1963,12(1):13-17.
- [2] NOUSHIN R, NASRIN S, MONA S, et al. Cytotoxic effects, apoptosis induction and cell cycle alterations in HT29 cells and T47D cells treated with Prodigiosin purified from *Serratia marcescens*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010,150:430.
- [3] WANG S L, WANG C Y, YEN Y H, et al. Enhanced production of insecticidal prodigiosin from *Serratia marcescens* TKU011 in media containing squid pen[J]. *Process Biochem*, 2012,47(1):1684-1690.
- [4] WILLIAMSON N R, FINERAN P C, LEEPER F J, et al. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006,4(12):887-889.
- [5] FRSTNER A. Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: a survey of the last 2500 years[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2003,42(31):3582-3603.
- [6] SLATER H, CROW M, EVERSON L, et al. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum sensing dependent and independent pathways[J]. *Mol Microbiol*, 2003,47(2):303-320.
- [7] GIRI A V, ANANDKUMAR N, M UTHUKUMARAN G, et al. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil[J]. *BMC Microbiol*, 2004,4(11):1-10.
- [8] TANIKAWA T, NAKAGAWA Y, MATSUYAMA T. Transcriptional down regulator hex S controlling prodigiosin and serrawettinW 1 biosynthesis in *Serratia marcescens*[J]. *Microbiol Immunol*, 2006,50(8):587-596.
- [9] 柳焕章, 刘建钊, 周敬霄. 微生物间拮抗的研究方法与农业应用[J]. *安徽农业科学*, 2011,39(3):1310-1314,1332.
- [10] JONG S L, YONG S K, SOOYEON P. Exceptional production of both prodigiosin and cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* SI-1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011,77(14):4967-4973.
- [11] TANIKAWA T, NAKAGAWA Y, MATSUYAMA T. Transcriptional down regulator hex S controlling prodigiosin and serrawettinW 1 biosynthesis in *Serratia marcescens*[J]. *Microbiol Immunol* 2006,50(8):587-596.