

# 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<sup>1</sup>, 薛斌<sup>2</sup>, 李桂娥<sup>1</sup>, 吴小扁<sup>1</sup>

(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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2-4]</sup>。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<sup>[5-6]</sup>。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<sup>[7-8]</sup>。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 1 g 土样,加入 100 ml 灭菌蒸馏水,稀释 100 倍,取 200 μl 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 3 d,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 GENE III 鉴定板,于 28 ℃ 培养,连续观察 48 h。

**1.2.2 16S rDNA 的扩增与序列分析。** 将菌种分别接种于 20、150 ml 种子培养基,37 ℃、180 r/min 培养 12 h。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 1.5 kbp 左右。引物序列:反向序列(1492R):GGTTACCTTGT-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,5 μl;5 U/μl 的 *Taq* DNA 聚合酶,0.5 μl;25 mmol/L 的 dNTP,1 μl;20 μmol/L 的引物,2 μl;模板 DNA,2 μl;双蒸水,39.5 μl;反应总体积 50 μl。PCR 反应条件为:预变性 95 ℃ 2 min,变性 95 ℃ 30 s,退火 53 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 45 s,32 个循环,72 ℃ 修复 7 min。

**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 ℃、180 r/min 振荡培养 12 h。以此为种子液,按 200 μl/平皿接种量涂布均匀,28 ℃ 培养 36 h。用药匙刮下红色菌苔,置于无水乙醇(20 ml/平皿)中浸提色素,充分振荡后,4 ℃ 静置 8 h,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 20~800 nm

**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。

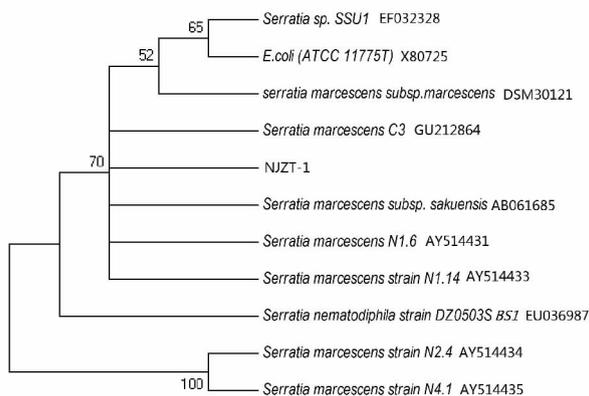


图 2 基于 16S rDNA 序列建立的菌株 NJZT-1 的系统发育进化树

**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波长为 535 nm,其分子结构中含有 3 个吡咯环<sup>[10]</sup>。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<sub>f</sub>)在 0.50 左右(图 6)。

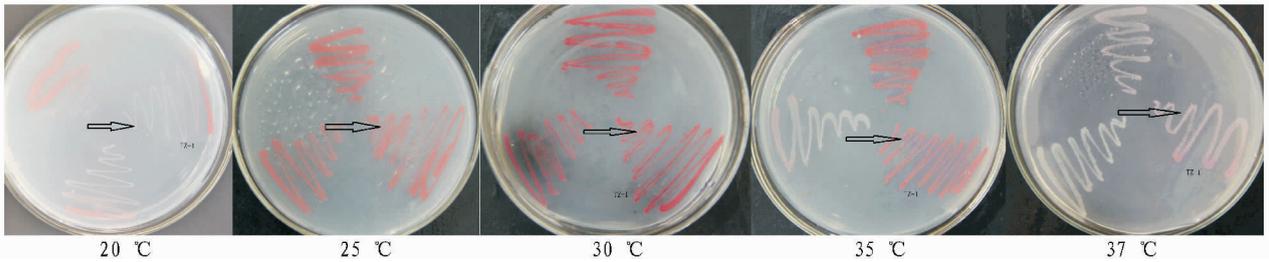


图4 NJZT-1 菌株在不同温度下的产色素能力

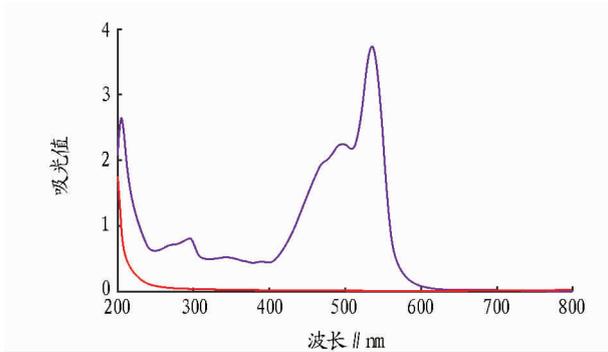


图5 红色素全波长扫描结果



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<sup>[11]</sup>。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.