

一株菌红素产生菌的鉴定及色素组分分析

崔恒林¹, 代春华¹, 董英¹, 陆玲², 秦怀兰²

(1. 江苏大学 生物与环境工程学院 江苏 镇江 212013; 2. 南京师范大学 生命科学学院 江苏 南京 210097)

摘要 :对分离自腌鱼的高产菌红素(bacterioruberin)的菌株 r - fish 进行了形态特征、生理生化特性与细胞化学组分的分析以及基于 16S rDNA 序列的系统发育分析。形态特征、生理生化特性及细胞化学组分的分析结果表明菌株 r - fish 为球形的嗜盐古菌。基于 16S rDNA 序列的系统发育结果表明, r - fish 与 *Halobacterium trapanicum* NCIMB 784 菌株的相似性为 99.8%, 归入 *Natronema* 属。用 TLC 法对 r - fish 的色素进行了分析, r - fish 的色素组分包括菌红素(bacterioruberin)、脱水菌红素(anhydrobacterioruberin)、双脱水菌红素(bisanhydrobacterioruberin)和一未知色素。与 *Halobacterium halobium* 和 *Halococcus morrhuae* 的色素组分相似。

关键词 :菌红素(bacterioruberin)、菌红素产生菌、嗜盐古菌; 16S rDNA 序列、系统发育树
中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1000 - 3096(2005)02 - 0043 - 06

在微生物产天然色素的开发研究中,类胡萝卜素是天然色素中研究最多、应用最广的一类带红橙黄色的脂溶性多烯色素。类胡萝卜素之所以引人注目,不仅仅是因为它是动物及人体所需的维生素 A 的前体,而且一系列流行病学研究和人体干预试验指出,通过饮食摄入富含类胡萝卜素的食物可以减少人类罹患一些疾病的危险^[1]。

在类胡萝卜素家族中,菌红素(bacterioruberin)是一类不常见的羟基化 C₅₀类胡萝卜素,属高碳类胡萝卜素。由于其特殊的结构与生物学效应,菌红素越来越被国内外研究者所关注^[2]。进而菌红素产生菌也成为研究者探寻的焦点。无论是从理论研究还是从应用开发的角度,此类微生物均是亟待开发的资源,不仅可用于微生物天然产物(红色素、相关药物)的开发研究,而且在开发盐碱地以及生产各种耐盐酶等方面均具有较大的潜力和广泛的应用前景。

作者对分离自腌鱼的一株高产红色素的嗜盐古菌菌株 r - fish 进行了形态特征、生理生化特性与细胞化学组分的分析以及基于 16S rDNA 序列的系统发育分析,以确证其分类地位,同时对其所产色素组分进行分析,希望为进一步开发、应用天然菌红素奠定初步的基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

益生盐杆菌(*Halobacterium halobium*) AS1. 1959

来自中国普通微生物菌种保藏中心 CGMCC; 鳕盐球菌(*Halococcus morrhuae*) AS1. 2085 来自中国普通微生物菌种保藏中心 CGMCC; 菌株 r - fish 分离自腌制的咸鱼。

1.2 形态特征、生理生化特性的分析

主要参照文献[3]进行。

形态特征:接种于牛奶 - 盐 - 琼脂培养基^[4], 37℃光照培养。光学显微镜下观察细胞形状,并测定大小。

嗜盐度试验:用 CM 培养基^[5], 37℃培养光照、振荡培养 6 d,于 460 nm 测定其 OD 值。

细胞色素的测定:用 CM 培养基培养、收集菌体,用氯仿 - 甲醇(1:1)溶液抽提,300 ~ 600 nm 分光光度计扫描。以鳕盐球菌为对照菌株。

糖类及醇类的利用:采用 MIB 培养基(g/L):酪素水解物 5, 酵母提取物 5, 丙三醇 1, MgCl₂ · 6H₂O 20, KCl 2, CaCl₂ · 2H₂O 0.2, NaCl 200。其中酪素分别以下

收稿日期: 2003 - 08 - 05; 修回日期: 2003 - 11 - 18

基金项目: 江苏大学青年自然科学基金资助项目(1241180004)

作者简介: 崔恒林(1970 -), 男, 江苏东台人, 讲师, 硕士, 主要研究方向: 微生物天然产物的研究与开发, 电话: 0511 - 8780174 E - mail : cuihenglin@sohu.com

述糖或醇替代, D-木糖、D-果糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、丙三醇。

其它生理生化特性:参照文献[6]进行水解淀粉试验、明胶水解试验、吲哚试验、H₂S测定、需氧试验、过氧化氢酶活性测定。

药敏试验:涂布于CM固体平板,稍干后放置药敏试片,37℃光照培养6d,观察有无抑菌圈。

1.3 细胞化学组分分析

嗜盐古菌甘油二醚类衍生物的提取及TLC分析:参照Ross等人^[7]的方法。全细胞氨基酸组分的分析:参照Hasegawa^[8]的方法。极性脂的分析:参照Oren^[9]的方法。

1.4 基于16S rDNA序列的系统发育分析

总DNA的提取:参照周培瑾等人^[10]的方法。16S rDNA的扩增:用引物 primer B (5'-TCCGGTTGATCCTGCCGGAG-3')和 primer H (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')扩增16S rDNA。PCR扩增条件:反应在PTC-200型PCR仪上进行。循环参数为95℃预变性5min,95℃变性40s,68℃退火和延伸2min,30个循环,最后72℃延伸8min。

16S rDNA序列的测定:以 primer B、primer H 和 primer N (5'-CCTCACGGTACGAGCTGACG-3')为测序引物,用310型ABI—PRISM全自动测序仪进行测序。

基于16S rDNA的系统发育学分析:从GenBank中调取嗜盐菌目38个模式菌株的16S rDNA序列(表2),用ClustalX(1.8)软件包排序,选择Methanosaeta concilii为外群,用MEGA2.0软件包中的Kimura 2-Parameter Distance模型和Neighbor-Joining法构建系统发育树,1000次随机抽样,计算bootstrap值以评估系统发育树的置信度,并计算各菌株的相似性的百分比。

1.5 嗜盐古菌色素组分的TLC分析

参照Gochnauer等^[11]的方法。将湿菌体转入带塞的玻璃试管并加入氯仿-甲醇(1:1),25℃,振荡抽提15min。过滤,离心,取上清。黑暗处冻干后溶于氯仿。加10倍体积的丙酮剧烈振荡,5000r/min离心5min,取上清。浓缩后转入1.5mL离心管,5000r/min离心5min。取上清点于硅胶G板进行TLC分析,展层剂为氯仿-甲醇(93:7)。

2 结果

2.1 形态特征、生理生化特性的分析

个体形态:r-fish为革兰氏阴性,球状,细胞单个、成对或不规则的成簇排列。其细胞大小为1.4~

1.6 μm。

培养特征:r-fish在牛奶-盐-琼脂培养基上生长良好。菌落表面光滑湿润、粘稠,呈鲑鱼红色,直径为1~2mm(37℃培养6d)。

嗜盐度试验:结果表明,r-fish在含18%~25% NaCl的培养基上生长良好(图1)。

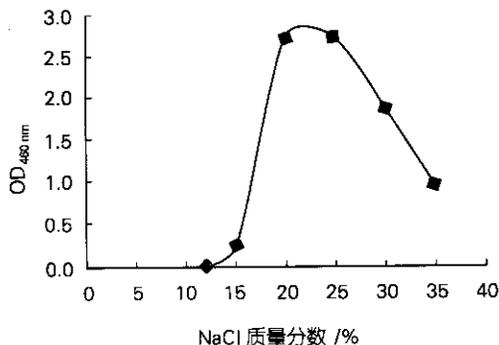


图1 NaCl浓度对r-fish生长的影响

Fig. 1 Effect of NaCl concentration on the growth of strain r-fish

细胞色素:r-fish菌株色素的光吸收峰在388, 494, 527nm,与Halococcus morrhuae的色素(类胡萝卜素)的光吸收峰一致。

糖类及醇类的利用:r-fish菌株利用D-木糖、D-果糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、乳糖、麦芽糖,不利用蔗糖、丙三醇。

生理生化特性及药敏试验结果见表1。

表1 LS-1菌株的生理生化特性及对抗生素的敏感性

Tab. 1 Differentiating physiological characteristics of strain

特征	<i>Halobacterium</i>	<i>Halococcus</i>	r-fish
	<i>halobium</i>	<i>morrhuae</i>	
淀粉水解	-	+	-
明胶水解	+	+	+
吲哚产生	-	+	+
过氧化氢酶活性	+	+	+
需氧性	+	+	+
H ₂ S产生	+	+	+
抗生素敏感性试验			
青霉素	-	-	-
氯霉素	-	-	-
链霉素	-	-	-
红霉素	-	-	-

2.2 细胞化学组分分析

含有一种甘油二醚类衍生物样品液的分析：甘油二醚类衍生物的 TLC 结果表明 *r-fish* 含有嗜盐古菌特征性的甘油二醚衍生物—— C_{20} 、 C_{20} 甘油二醚核心类脂。嗜盐古菌二氨基庚二酸(DAP)的测定：二氨基庚二酸(DAP)的测定结果表明 *r-fish* 与 *Halococcus morrhuae* 的水解样品中均不含二氨基庚二酸(DAP)。

极性脂的分析：*r-fish* 菌株含 PG 和 PGP 为主要磷脂，并含有 2 种糖脂。

2.3 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析

嗜盐古菌 *r-fish* 16S rDNA 的扩增结果：扩增出的 DNA 片段条带单一，大小约为 1.5 kb，与嗜盐古菌已知菌株 16S rDNA 的片段大小相符，且阴性对照样品无扩增带。

嗜盐古菌 *r-fish* 16S rDNA 的序列：测出的菌株 *r-fish* 16S rDNA 序列长度为 1459 bp，并已在 GenBank 注册，其 Accession number 为 AF 367370。

基于 16S rRNA 基因的系统发育树：基于 Kimura 2-Parameter Distance 模型用 Neighbor-Joining 法构建的系统发育树见图 3。各菌株所属的属均在竖线右边标出，共 12 个属，即 *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Natrorubrum*, *Natrialba*, *Natronococcus*, *Haloferax*, *Halobaculum*, *Halorubrum*, *Halococcus*, *Halobacterium*, *Natronomonas*, *Haloarcula*。

2.4 色素组分分析

在图 2 的 TLC 图谱上，*r-fish* 的色素组分与

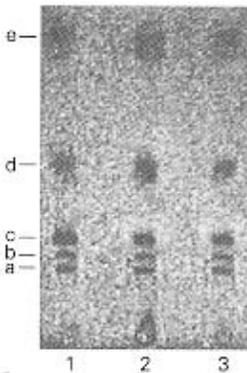


图 2 嗜盐古菌色素的 TLC 图谱

Fig. 2 TLC patterns of pigments of all strains

1. *Halobacterium halobium* 2. *Halococcus morrhuae* 3. *r-fish*

Halobacterium halobium 和 *Halococcus morrhuae* 的色素组分相同，且每一组分的相对质量分数并无明显差

异。根据 Gochnauer 等人^[11]的结果 a 和 b 应为菌红素(bacterioruberin)的两种同分异构体(isomer), c 为脱水菌红素(anhydrobacterioruberin), d 为双脱水菌红素(bisanhydrobacterioruberin) e 为未知色素。

3 讨论

r-fish 菌株为好氧的嗜盐球菌，在 NaCl 浓度大于 12% 的培养基上才能生长，对青霉素和氯霉素等真细菌的抑制剂不敏感，并且菌体细胞中含类胡萝卜素。*r-fish* 菌株细胞壁中不含二氨基庚二酸(DAP)，细胞膜中含有甘油二醚类衍生物。初步具备嗜盐古菌的特性。

由图 3 的系统发育树可以看出，所选嗜盐古菌目的 39 个菌株聚成 12 个大的分支，这 12 个分支代表着目前嗜盐古菌目中属级水平的分支。

从系统发育树上可以看出，在这些分支中 *Natrinema* 属与 *Haloterrigena* 属关系较近。1998 年 Terry 等人^[12]建议建立新属——*Natrinema*，通过基于 16S rDNA 序列的系统发育研究将 *Halobacterium trapanicum* NCIMB784, *Halobacterium halobium* NCIMB777, *Halobacterium salinarium* NCIMB786 归入该属，同时认为，*Halobacterium trapanicum* NCIMB784, *Halobacterium halobium* NCIMB777 应为同一种，建议命名为 *Natrinema pallidum*，*Halobacterium salinarium* NCIMB786 命名为 *Natrinema pellirubrum*。Terry 等人还认为 *Halobacterium trapanicum* NCIMB 767, L-11 为同一种的不同菌株也应归入 *Natrinema* 属。1999 年 Antonio 等人^[13]建议建立新属——*Haloterrigena*，通过基于 16S rDNA 序列的系统发育研究将 *Halobacterium trapanicum* NCIMB784, *Halococcus turkmenicus* VKM B-1734, *Halobacterium trapanicum* JCM9743, *Halobacterium trapanicum* NCIMB 767 和 GSL-1(L-11) 归入 *Haloterrigena* 属。上述两研究者争论的焦点在于 *Halobacterium trapanicum* NCIMB784, *Halobacterium trapanicum* NCIMB 767, L-11 的归属问题。我们注意到 Terry 等人在进行重构系统发育树时并未包含 *Halococcus turkmenicus* VKM B-1734，并且他们是以较高的 16S rDNA 序列的相似性(>98%)作为定种的标准，而 Antonio 等人的研究中，虽然对 *Halococcus turkmenicus* VKM B-1734, *Halobacterium trapanicum* JCM9743, *Halobacterium trapanicum* NCIMB 767 和 GSL-1(L-11) 进行了交叉杂交，并认为此三者应归为一种，但杂交试验并未包括 *Halobacterium trapanicum* NCIMB 784，因此 *Halobacterium trapanicum* NCIMB 784 成为争议的焦点。从 16S rDNA 序列的相似性来看，*Natrinema* 属内各菌株间的

表 2 嗜盐古菌 16S rDNA 序列分析用菌株

Tab.2 Strains used in the 16S rDNA sequence analysis

菌种	菌株	长度(bp)	登录号
1. <i>Haloarcula japonica</i>	TR - 1	1424	D 28872
2. <i>Haloarcula marismortui</i>	HH 10	1472	X 61689
3. <i>Haloarcula marismortui</i>	He8	1472	X 61688
4. <i>Haloarcula sinaiiensis</i>	ATCC 33800	1470	D 14130
5. <i>Halobacterium halobium</i> NCIMB 777	NCIMB 777	1463	AJ 002949
6. <i>Halobacterium halobium</i> R1	R1	1473	M 11583
7. <i>Halobacterium salinarium</i>	NCIMB 786	1458	AJ 002947
8. <i>Halobacterium sodomense</i>	ATCC 33755	1469	D 13379
9. <i>Halobacterium</i> sp.ch2	Ch2	1469	L 00922
10. <i>Halobacterium</i> sp. Y12	Y12	1471	D 14127
11. <i>Halobacterium trapanicum</i> NCIMB 767	NCIMB 767	1472	D 14125
12. <i>Halobacterium trapanicum</i> NCIMB 784	NCIMB 784	1481	AF 027738
13. <i>Halobacterium trapanicum</i> NRC 34021	NRC 34021	1460	X 82168
14. <i>Halobaculum gomorrhense</i>		1474	L 37444
15. <i>Halococcus morrhuae</i>		1475	X 00662
16. <i>Halococcus morrhuae</i>	NRC 16008	1474	D 11106
17. <i>Halococcus saccharolyticus</i>	ATCC 49257	1472	AB 004876
18. <i>Halococcus salifodinae</i> BIP	BIP	1302	Z 28387
19. <i>Halococcus salifodinae</i>	BG2/2	1422	AJ 131458
20. <i>Halococcus salifodinae</i>	Br - 3	1465	AJ 238897
21. <i>Halococcus turkmenicus</i>	VKM B - 1734	1473	AB 004878
22. <i>Haloferax denitrificans</i>	ATCC 35960	1469	D 14128
23. <i>Haloferax gibbonsii</i>	ATCC 33959	1470	D 13378
24. <i>Haloferax mediterranei</i>	ATCC 33500	1472	D 11107
25. <i>Halorubrum distributum</i>	JCM 9100	1467	D 63572
26. <i>Halophilic archaeum</i> L - 11	L - 11	1472	D 14126
27. <i>Halorubrum lacusprofundi</i>	ACAM 34	1464	X 82170
28. <i>Halorubrum saccharovorom</i>	NCIMB 2081	1460	X 82167
29. <i>Halorubrum trapanicum</i>	JCM8979	1472	D 63786
30. <i>Haloterrigena thermotolerans</i>	PR5	1451	AF 115478
31. <i>Natrialba asiatica</i> 172P1	172P1	1469	D 14123
32. <i>Natrialba asiatica</i> BIT	BIT	1470	D 14124
33. <i>Natrinema versiforme</i>	XF10	1438	AB 023426
34. <i>Natronobacterium bangense</i>	A33	1475	Y 14028
35. <i>Natronobacterium tibetense</i>	GA33	1474	AB 005656
36. <i>Natronococcus amylolyticus</i>	Ah - 36	1475	D 43628
37. <i>Natronococcus occultus</i>	NCIMB 2192	1464	Z 28378
38. <i>Natronomonas pharaonis</i>	JCM8858	1465	D 87971
39. r - fish	r - fish	1459	AF 367370
40. <i>Methanosaeta concilii</i>		1471	X 16932

相似性为 97.6% ~ 99.8% , *Haloterrigena* 属内各菌株间的相似性为 96.6% , 这两属的菌株间的相似性为 95.4% ~ 99.8% , 我们认为不排除将这两个属合并为一属的可能性。要解决这一问题必须将两属的菌株进

行进一步的不同菌株间的 DNA - DNA 交叉杂交 (cross - hybridization) 分析 , 彻底搞清楚各菌株间的关系 , 同时进一步探讨属的一般特征。

作者的待鉴定菌株 r - fish 以 95% 的置信度与

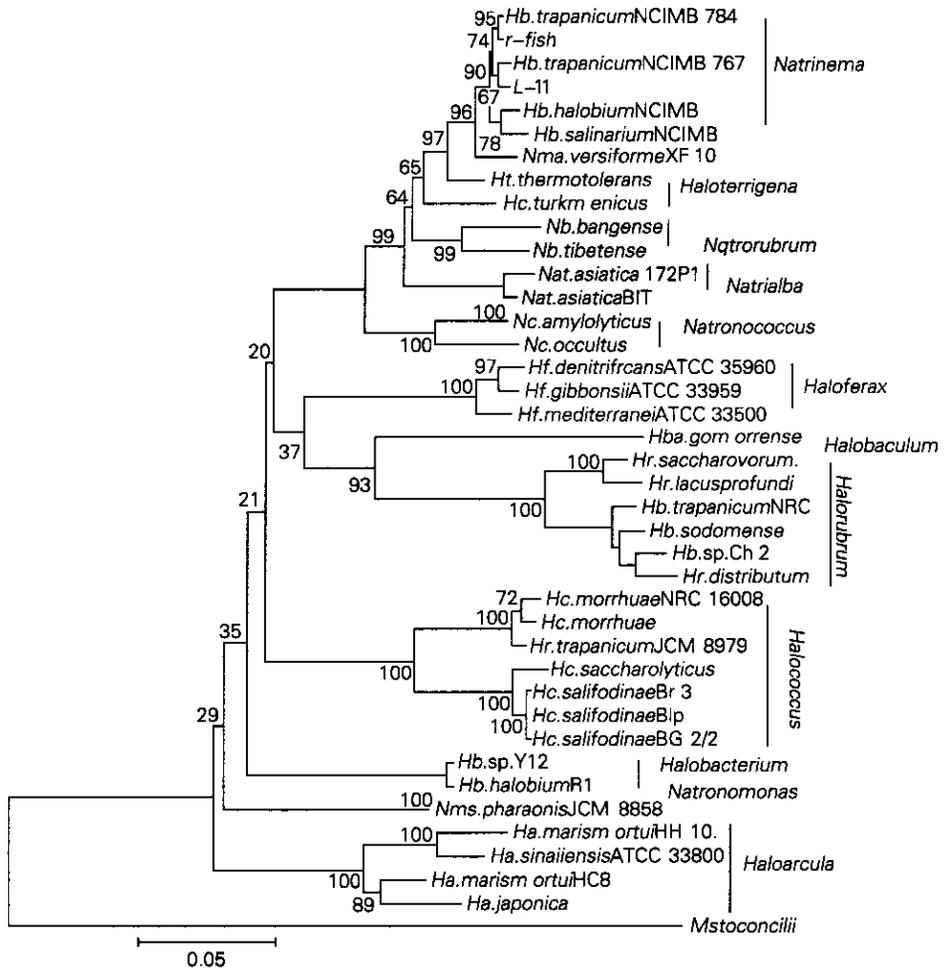


图3 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of all strains scale bar represents 0.05 mutational events per site

Halobacterium trapanicum NCIMB 784 聚成一分支,并且与 *Halobacterium trapanicum* NCIMB767, L-11, *Halobacterium halobium* NCIMB777, *Halobacterium salinarium* NCIMB786 的分支聚成一个较紧密的分支。r-fish 与它们的相似性分别为 99.8%, 99.3%, 99.0%, 99.2% 98.9%。*Halobacterium trapanicum* NCIMB767 与 L-11 以 99.2% 的 16S rDNA 序列的相似性聚在一起, *Halobacterium halobium* NCIMB777、*Halobacterium salinarium* NCIMB786 以 99.1% 的序列相似性聚在一起,它们均归入 *Natrinema* 属。因此作者的结果基本支持 Terry 等人的结论。同时值得注意的是 r-fish 为球形的古菌且在生理生化特征上与杆形的 *Halobacteri-*

um trapanicum NCIMB 784 有一定的差异^[12]。在系统发育树上,同属的种能以较好的置信度聚在一起。因此,16S rDNA 序列的分析在属水平的分类研究中具有较好分辨率和优越性,但在种水平的分类研究中分辨率较低。

作者用于色素组分分析的三个菌株 r-fish, *Halobacterium halobium* 和 *Halococcus morrhuae* 分别属于 *Natrinema* 属、*Halobacterium* 属和 *Halococcus* 属。在系统发育关系较远的这些属中,它们在色素的组成上却有较好的一致性——均含有菌红素,且各组分的相对含量较为一致。这一性状的存在可能是与这一类群总是分布于极端高盐的环境相一致的。

参考文献：

- [1] 王业勤,李勤生. 天然类胡萝卜素——研究进展、生产、应用[M]. 北京:中国医药科技出版社,1997.95~96.
- [2] Krubasik P, Kobayashi M, Sandmann G. Expression and functional analysis of a gene cluster involved in the synthesis of decaprenoxanthin reveals the mechanisms for C₅₀ carotenoid formation[J]. **European Journal of Biochemistry**, 2001, **268**(13):3 702–3 708.
- [3] Grant W D, Larsen H. Extremely halophilic archaeobacteria. order *Halobacteriales ord. nov*[M]. In: Staley J T, Bryant M P, Pfennig N, *et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology(3)[C]. Baltimore:The Williams & Wilkins Company, 1989.2 216–2 233.
- [4] Kocur M, Hodgkiss W. Taxonomic status of the genus *Halococcus Schoop*[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1973, **23**(2): 151–156.
- [5] Gochnauer M B, Kushner D J. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria[J]. **Can J Microbiol**, 1969, **15**:1 157–1 165.
- [6] 王大珍,周培瑾,田新玉,等. 极端嗜盐菌新种的鉴定[J]. 微生物学报. 1984, **24**(4):304–309.
- [7] Ross H N M, Collins M D, Tindall B J, *et al.* A rapid procedure for the detection of archaeobacterial lipids in halophilic bacteria[J]. **J Gen Microbiol**, 1981, **123**:75–80.
- [8] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes[J]. **J Gen Appl Microbiol**, 1983, **29**:319–322.
- [9] Oren A, Gurevich P, Gemmell R T, *et al.* *Halobaculum gomorrense* gen. nov., a novel extremely halophilic archaeon from the Dead Sea[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1995, **45**(4):747–754.
- [10] 周培瑾,徐毅,马允卿,等. 极端嗜盐菌 16S rDNA 的 PCR 扩增[J]. 微生物学报,1994, **34**(1):6–8.
- [11] Gochnauer M B, Kushner D J. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria[J]. **Can J Microbiol**, 1969, **15**:1 157–1 165.
- [12] McGenity T J, Gemmell R T, Grant W D. Proposal of a new halobacterial genus *Natrinema* gen. nov., with two species *Natrinema pellirubrum* nom. nov. and *Natrinema pallidum* nom nov[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1998, **48**(4):1 187–1 196.
- [13] Ventosa A, Gutierrez M C, Kamekura M, *et al.* Proposal to transfer *Halobacterium trapanicum* JCM 9743 and strain GSL-11 to *Haloterrigena turkmenica* gen. nov., comb. nov. [J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1999, **49**(1):131–136.

Identification of a bacterioruberin – producing microorganism and analysis of its pigment

CUI Heng – lin¹, DAI Chun – hua¹, DONG Ying¹, LU Ling², QIN Huai – lan²

(1.School of biological and environmental engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China ; 2.College of life sciences ,Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Received :Aug.,5,2003

Key words : bacterioruberin ; bacterioruberin – producing microorganism; halophilic archaeon; 16S rDNA sequence; phylogenetic tree

Abstract : A strain r – fish that produces red pigments was isolated from salted fish. Based on its morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics, strain r – fish is certainly an coccoid extremely halophilic archaeon. Phylogenetic analysis results indicate that r – fish and *Halobacterium trapanicum* NCIMB 784 both belong to the genus of *Natrinema* at the similarity of 99.8%. The red pigments of r – fish were isolated and subjected to TLC analysis. The red pigments of r – fish contained, bacterioruberin, anhydrobacterioruberin, bisanhydrobacterioruberin and an unidentified pigment, similar to the pigment compositions of *Halobacterium halobium* and *Halococcus morrhuae*.

(本文编辑 :刘珊珊)