

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (4) :424 - 432; 4 April 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.009

两株茶树内生草螺菌的微生物学特性

王婷, 杨升, 陈亚雪, 胡玲玲, 屠琴, 张丽, 刘雪芹, 王行国*

湖北大学生命科学学院, 湖北 武汉 430062

摘要: 【目的】从健康茶树叶片内分离两株内生乳白色短杆菌(编号 WT00C 和 WT00F) 并进行微生物学特性调查。【方法】通过细菌培养和染色的方法进行了形态观察; 通过微生物生理生化分析的方法进行了生物活性测定, 还进行了 16S rDNA 序列分析以及生理生化特性调查; 通过系统发育学分析及各项指标的比较, 确定两个菌株的分类归属。【结果】两株细菌菌落形态为圆形、不透明、乳白色、中央隆起、边缘整齐。菌体呈杆状, 大小为 $(0.5 - 0.7) \mu\text{m} \times (1.4 - 1.8) \mu\text{m}$, 有鞭毛, 无芽孢, 革兰氏染色阴性, 产生 IAA、 NH_4^+ 和嗜铁载体但无固氮酶活性。WT00C 和 WT00F 菌株产生 IAA 量分别为 $18.7 \pm 1.2 \text{ mg/L}$ 和 $24.9 \pm 1.5 \text{ mg/L}$ 。除不能利用丙酸盐外, 它们的生理特征与伯杰氏手册中草螺菌属生化指标中的可利用碳源情况基本一致, 并且与已鉴定的 13 种草螺菌的 16S rDNA 高度同源, 相似度达 99%。基于 16S rDNA 序列的系统发育学分析结果显示, 两株细菌形成一个独立的分支, 与已报道的 13 种草螺菌聚类并保持着一定的距离, 两个菌株的生理生化特征与其它草螺菌有许多共性但存在明显的差别。【结论】分离获得的两株茶树内生细菌 WT00C 和 WT00F 为草螺菌属的新菌株。

关键词: 茶树草螺菌, 内生细菌, 细菌鉴定

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2014)04-0424-09

草螺菌 (*Herbaspirillum* spp.) 是近 20 年内才发现的一类嗜用有机酸、耐性强、微需氧、略呈弯曲的革兰阴性非发酵杆菌, 可在高糖培养基上生长但不利用蔗糖的新细菌类群, 隶属于 β -变形菌纲 (b-Proteobacteria) 草酸杆菌科 (Oxalobacteraceae)。早期被归类于固氮螺菌属 (*Azospirillum*) 的织片草螺菌 (*Herbaspirillum seropedicae*) 是第一个归于草螺菌属的细菌。截至 2012 年底, 已报道并鉴定的草螺菌有 13 个种, 即 *H. seropedicae*^[1], *H. rubrisubalbicans*^[2], *H. frisingense*^[3], *H. lusitanum*^[4], *H. chlorophenicum*^[5], *H. autotrophicum*^[6], *H. huttiense* subsp. *Huttiense*^[6,9],

H. huttiense subsp. *Putei*^[6,9], *H. hiltneri*^[7], *H. rhizosphaerae*^[8], *H. aquaticum*^[9], *H. canariense*^[10], *H. aurantiacum*^[10], *H. soli*^[10]。草螺菌属细菌大多是微需氧细菌, 能利用的碳源包括糖醇类 (D-葡萄糖, D-果糖, 甘油, D-和 L-阿拉伯糖, D-和 L-阿拉伯糖醇, D-半乳糖, D-核糖, D-木糖, 木糖醇, D-甘露糖, 甘露糖醇, 山梨糖醇), 有机酸类 (DL-乳酸盐, 甘油酸盐, 柠檬酸盐, D-和 L-苹果酸盐, 琥珀酸盐, 富马酸盐, 葡糖酸盐, meso-酒石酸盐, 丙酮酸盐, α -酮戊二酸盐, 2/5-酮葡糖酸盐, 丙酸盐, 正/异丁酸盐, 正/异戊酸盐, DL-3-羟基丁酸盐, DL-4-氨基丁酸盐, 顺乌头酸盐, 内消旋-乌头

基金项目: 湖北省科技厅项目 (2011BFA003)

* 通信作者。Tel: +86-27-88661237-8066; Email: xgwang@hubu.edu.cn

作者简介: 王婷 (1985 -), 女, 湖北荆门人, 硕士研究生, 研究方向为微生物分子生物学。

收稿日期: 2013-08-28; 修回日期: 2013-12-07

酸盐,对-羟基苯甲酸,乙酸乙酯,癸酸盐,衣康酸盐,丙酸盐)和氨基酸类(L-亮氨酸,L-苏氨酸,L-天门冬氨酸,L-谷氨酸,L-脯氨酸,D/L-丙氨酸);不能利用的碳源有七叶苷,熊果苷,水杨苷,D-纤维二糖,麦芽糖,蔗糖,海藻糖,菊糖,D-酒石酸盐,D-棉子糖,淀粉,L-苯丙氨酸,DL-5-氨基戊酸盐,甜菜碱、戊二酸盐,组氨酸,山梨糖,半乳糖醇,糖原,邻苯二甲酸盐,草酸盐,马来酸盐^[11]。此外,与其它属细菌不同,该属内细菌的DNA相似度较高,16S rDNA相似性为98.5% - 99.4%,DNA G + C含量为61% - 65%^[12]。

草螺菌大多分布于植物根部或茎秆,多数情况下位于细胞的原生质外部。一些草螺菌具有固氮能力,常见于禾谷类植物和双子叶植物中。在含氮量丰富的土壤中栽培的农作物中出现的频率较高,如玉米、小麦、甘蔗、高粱、香蕉和菠萝^[1,13-14]。也有一些草螺菌不能固氮,有的草螺菌如*H. chlorophenicum*还具有高效降解氯酚的能力^[6]。由于多数草螺菌具有固氮或产生植物激素的功能并具有使宿主植物增产的潜能,因此逐渐受到人们重视。Baldani等^[15]发现,接种了织片草螺菌(*H. seropedicae*)的植株,根部发育明显加快。Eckert等^[16]也发现*H. frisingense*也具有相同的功效。目前织片草螺菌已广泛应用于田间作物的研究,经高粱和水稻接种织片草螺菌,产量明显提高^[17]。虽然在植物中鲜有严重致病草螺菌的报道,但在病人体内发现了草螺菌。Michael等2005年首次报道了草螺菌在人体内引发菌血症^[18],随后有人从囊性纤维化病和急性淋巴细胞白血病患者体内分离出了草螺菌^[19-20]。但其中多数致病草螺菌尚未进行详细的分类学鉴定。由此可见,草螺菌细菌的生理功能以及生态学分布均比较复杂多样。

至今,典型的草螺菌主要从农作物中分离获得,但迄今为止尚未见从茶树中分离或利用草螺菌的报道。本实验室已从茶树不同部位分离出6株内生菌,本文报道其中2株乳白色短杆内生菌(编号WT00C和WT00F)的生物活性调查和微生物鉴定的实验结果。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

茶树样本是2011年秋季采自武汉东湖磨山公

园栽培的多年生茶树树冠顶部的叶片。

用于细菌培养的蛋白胨等均购自Oxoid公司;生物素、山梨糖醇等购自Sigma公司;氨苄青霉素等抗生素均购自Amresco公司;ExTaq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、pMD18-T simple vector连接试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;DNA凝胶回收试剂盒、PCR清洁试剂盒购自Axygen Scientific, Inc;DNA分子量购自Ferments公司;DNA引物由上海桑尼生物技术公司合成。其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 菌株的分离与纯化

参照植物内生菌分离的组织块培养法^[21],将所采集的茶树叶片样本先用清水冲洗干净,再用75%酒精消毒30 s,然后用1%升汞消毒处理茶树叶片3 min。最后用无菌水冲洗3次。为检验表面消毒效果,将最后一次的无菌水清洗液涂布牛肉膏蛋白胨平板(NA)作对照,28℃培养3 d,以确定实验材料表面消毒是否彻底。

将消毒处理的茶树叶片切去边缘部分,将内部组织切小块放置于牛肉膏蛋白胨固体平板中,28℃培养,每隔12 h进行观察,48 h后将长出的菌体转接至相同的培养基上,继续培养48 h,然后用梯度稀释涂平板法和平板划线筛选单菌落。将培养后长出的单个菌落分别挑出,接种牛肉膏蛋白胨培养基,28℃培养后收集细菌并加甘油,-80℃冰箱贮存。

1.3 形态学观察

将活化的菌株涂布牛肉膏蛋白胨平板,28℃培养48 h。肉眼观察菌落大小、形状、颜色等表型。菌株经革兰氏染色、鞭毛染色或芽孢染色^[22]后,用光学显微镜观察。

1.4 生物活性测定

参考Bric等人^[23]的方法定性检测细菌产生植物生长激素(IAA)的能力。定量测定时则首先用分光光度计测定菌悬液的 OD_{600} 值,然后3040 × g离心10 min,取上清液并加入两倍体积Salkowski比色液,避光静置25 min,测定溶液的 OD_{530} 值。计算菌浓度 OD_{600} 值为1时,单位体积菌悬液中细菌分泌的IAA量。

参考Gour^[24]的方法检测细菌的溶磷能力。将分离的2个菌株分别接种Pikovskaya固体培养基(1 L培养基中含0.5 g酵母提取物、10 g葡萄糖、5 g Ca_3PO_4 、0.5 g $(NH_4)_2SO_4$ 、0.3 g KCl、0.3 g NaCl、0.03 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.03 g $MnSO_4$ 、0.003 g $FeSO_4$ ·

7H₂O、18 g 琼脂, 调节 pH 7.0 - 7.5), 于 30℃ 培养 5 d。观察菌落周围有无透明晕圈, 若有透明晕圈则表明细菌具有溶磷能力。

参考《微生物实验手册》^[25] 介绍的方法检测细菌产 NH₄⁺ 能力。将两个菌株接种肉汁胨培养基 (10 g 蛋白胨, 5 g NaCl, ddH₂O 1 L) 中, 30℃ 培养 3 d, 加萘氏试剂观察颜色变化, 若变为红色则表明能产生铵态氮 (NH₄⁺)。

参考 Schwyn 和 Neilands^[26] 的方法检测细菌产嗜铁载体 (Siderophore) 能力。将菌株接种于 CAS 检测平板中, 30℃ 培养 3 d 后观察菌落周围有无黄色晕圈, 出现黄色晕圈则表明有嗜铁载体产生。

1.5 16S rDNA 克隆、测序与分析

按照分子生物学常规方法, 首先用 LB 培养基 37℃ 培养细菌并抽提细菌基因组 DNA, 再使用引物 F27 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 R1492 (5'-ACGGTTACCTTGTACGACTT-3') PCR 扩增 16S rDNA; 最后用 DNA 凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增的目的条带并连接到 pMD-18T 载体上, 转化 *E. coli* DH5a。筛选出的转化子送华大基因科技股份有限公司测序。

分别将测序的 16S rDNA 序列对 NCBI 数据库 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行 BLAST 搜索, 并使用 CLUSTAL_X^[27] 进行多重序列比对。然后使用 MEGA5 软件^[28] 并采用邻接法 (Neighbor-joining) 进行聚类分析, 构建系统进化树。

1.6 生理生化特征测定

参照草螺菌的鉴定方法^[1], 选择性地进行了生化指标测定, 主要包括: 荧光色素试验、生长温度试验、生长 pH 试验、耐盐性试验、抗生素敏感试验; 唯一碳源利用试验; 丙二酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐利用试验; 葡糖酸盐氧化和葡萄糖等碳源氧化产酸试验; 硝酸盐、亚硝酸盐还原试验和反硝化试验; 色氨酸酶、苯丙氨酸脱氨酶、色氨酸脱氨酶、尿素酶、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶、氧化酶、过氧化氢酶、β-半乳糖苷酶、碱性磷酸酶和脂肪酶活性试验; 精氨酸双水解试验; 吐温、淀粉和七叶灵水解、明胶液化试验等。

1.7 固氮酶活性检测

参照文献 [29] 介绍的方法, 将 WT00C 和 WT00F 菌株分别接种无氮源的 Ashby 和 JNFb 培养基^[29] 中, 置 34℃ 温箱中培养, 使含有溴百里酚蓝的

JNFb 培养基由绿色变为蓝色为阳性。

使用文献报道的简并引物^[30-31] (*nifD* 上游引物 5'-TGGGGICCIRTIAARGAYATG-3' 和下游引物 5'-TCRTTIGCIATRTGRTGNCC-3', *nifH* 上游引物 5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3' 和下游引物 5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'), PCR 扩增细菌基因组 DNA, 预期大小的 DNA 条带为 360 bp (*nifH*) 和 390 bp (*nifD*)。

2 结果

2.1 两株细菌的形态特征与生物活性

从健康茶树叶片中分离的 WT00C 和 WT00F 菌株在牛肉膏蛋白胨平板上生长的菌落呈乳白色、不透明、圆形、中央隆起、边缘整齐 (图 1)。革兰氏染色显示两株菌都呈革兰氏阴性。菌体呈微曲杆状, 大小为 (0.5 - 0.7) μm × (1.4 - 1.8) μm。穿刺试验和鞭毛染色显示细菌能运动、有鞭毛, 芽孢染色则未见芽孢。

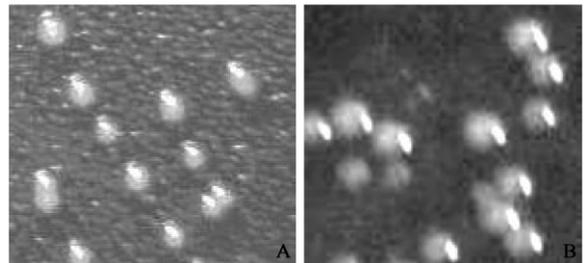


图 1. 细菌菌落

Figure 1. Bacterial colonies. A: WT00C; B: WT00F.

鉴于许多植物内生菌具有促进植物生长发育的功能, 因此我们测试了 WT00C 和 WT00F 菌株产生植物激素吲哚乙酸 (IAA)、NH₄⁺、嗜铁载体以及溶磷能力。WT00C 和 WT00F 都能使 Salkowski 溶液变成粉红色, IAA 含量分别为 18.7 ± 1.2 mg/L 和 24.9 ± 1.5 mg/L; 产 NH₄⁺ 试验显示两者能使萘氏试剂变红; 产嗜铁载体试验也显示两者菌落周围出现黄色晕圈, 但溶磷试验则未显示透明晕圈。生物活性调查揭示, WT00C 和 WT00F 菌株都产生 IAA、NH₄⁺ 和嗜铁载体, 但无溶磷作用。

2.2 16S rDNA 序列测定与系统进化树分析

用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增后, 在 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分离获得一条约 1.5 kb DNA 片段。回收该片段并进行 DNA 测序, 将得到

序列进行 EzTaxon^[32] 比对, 发现 WT00C 与 WT00F 之间的 16S rRNA 基因序列同源性高达 99.7%。用两者的 16S rDNA 在 NCBI 数据库中进行 BLAST 搜索, 发现它们与数据库中的草螺菌 *Herbaspirillum* sp. Os30、*Herbaspirillum* sp. Os31、*Herbaspirillum* sp. clone A4H6M9、*Herbaspirillum* sp. Os23 等 16S rDNA 同源, 相似度高达 99%。提示 WT00C 和 WT00F 菌株可能为草螺菌属的细菌。为了进一步判定 WT00C 和 WT00F 菌株是否可能为草螺菌属的细菌, 从 Genbank 数据库找出已鉴定的 13 种草螺菌 16S rDNA 序列并利用 CLUSTAL_X^[27] 进行 16S rDNA 多重序列比对, WT00C 和 WT00F 与 13 种草螺菌的 16S rDNA 序列高度同源, 相似度达 99%。

在基于 16S rDNA 序列的系统发育学分析中, 29 个菌株分别类聚于不同的分支中, 同种的菌株都类聚在一起, 只有作为外群的一种固氮菌 (AF214644) 独立于草螺菌属细菌之外 (图 2)。

WT00C 与 WT00F 的遗传进化距离最近, 同处一个最小的独立分支, 与 *H. aquaticum* 和 *H. huttiense* 的亲缘关系相对较近, 但又分别处在不同的进化分支内。两者与其它草螺菌的遗传进化距离相对较远, 但与最早鉴定的织片草螺菌 (*H. seropedicae*) 呈现明显的遗传进化关系。结合 16S rDNA 序列比对和系统进化树的分析结果, 推测 WT00C 和 WT00F 菌株均为草螺菌属的一员, 两者应同属一个种。

2.3 分离菌株的生理生化特征

菌株 WT00C 和 WT00F 均不产生荧光色素, 适宜生长温度为 30 - 37℃, 最适 pH 5.5 - 6.5, 能在 1% NaCl 中良好生长; 当 NaCl 终浓度 $\geq 1.5\%$ 时表现明显的生长抑制。生理生化特征分析表明, WT00C 和 WT00F 菌株能在苹果酸盐、琥珀酸盐、柠檬酸盐、 α -酮戊二酸盐、富马酸盐、丙酮酸盐、乌头酸盐、甘露醇、甘油、山梨醇、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖等作为唯一碳源的培养基上生长。两株菌除不能利

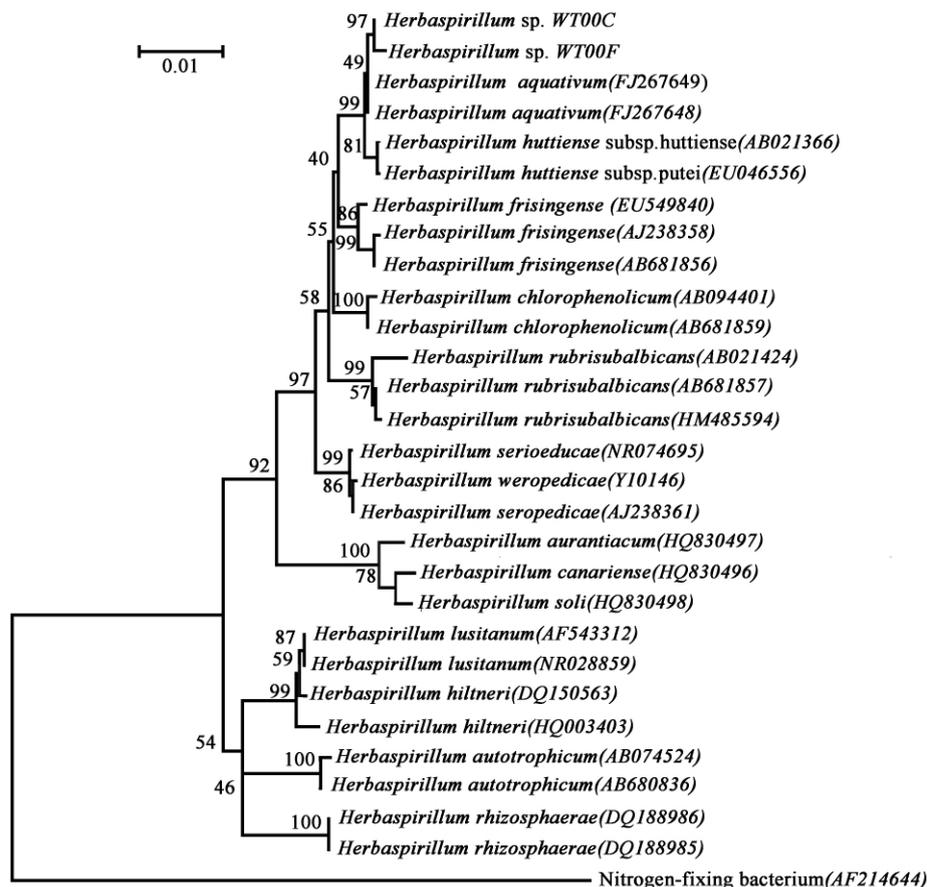


图 2. 利用 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树

Figure 2. Neighbor-joining tree generated by MEGA5 based on the 16S rRNA gene sequences of 29 bacterial strains. The distance scale (0.01) was given in the bottom-left corner, and bootstrap values reflecting the percentage of bootstrap trees were also given at the endpoints of that branch. The accession number for each bacterial strain were given in brackets.

用丙酸盐外,与伯杰氏手册^[1]中草螺菌属生化指标中的可利用碳源情况基本一致。两株细菌均有 β -半乳糖苷酶、色氨酸脱氨酶、尿素酶和氧化酶活性,但没有苯丙氨酸脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、精氨酸脱羧酶、精氨酸双水解酶、碱性磷酸酶、固氮酶、脂肪酶活性;既不能产生吡啶也不能水解淀粉、七叶灵和明胶。两者均具硝酸盐还原能力,但不具亚硝酸盐还原能力和反硝化能力。它们均能水解 Tween 20 和 Tween 40,微弱水解 Tween 60 但不能水解 Tween 80(表 1)。

WT00C 和 WT00F 菌株均不能在 Ashby 和 JNFB 培养基^[29]中很好地生长,也不能使含有溴百里酚蓝的 JNFB 培养基由绿色变为蓝色。这一结果暗示 WT00C 和 WT00F 菌株可能无固氮功能。为了进一步证实两株细菌无固氮酶活性,使用文献报道的简并引物^[30-31],PCR 扩增细菌基因组 DNA,但均未得到预期大小的 DNA 条带。WT00C 和 WT00F 菌株中不能检测到 *nifD* 和 *nifH* 基因。结合生化测定和固氮酶基因 *nifH* 和 *nifD* 扩增的结果,判定 WT00C 和 WT00F 菌株都不具固氮酶活性。

WT00C 和 WT00F 菌株的生理生化指标并不与已鉴定的 13 种草螺菌中任何一个完全相符(表 1)。即使与亲缘关系较近的 *H. aquaticum* 和 *H. huttense* 比较,WT00C 和 WT00F 菌株也显示明显的不同,如前两者不能还原硝酸盐、不能利用 D-甘露糖和 L-鼠李糖却利用 L-海藻糖作唯一的碳源且无 β -半乳糖苷酶活性,而后两者正好相反,它们不仅还原硝酸盐、利用 D-甘露糖和 L-鼠李糖但不能利用 L-海藻糖作唯一的碳源且具有 β -半乳糖苷酶活性。

两个分离菌株之间也有差异。WT00C 显示过氧化氢酶活性而 WT00F 则没有(表 1)。两株细菌能够利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-甘露糖等多种糖类作为唯一碳源,但不能利用蔗糖、海藻糖等作为唯一碳源,并可利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-核糖等多种糖类氧化产酸。但两株菌之间在利用 D-果糖,甘油,甘露醇,乳糖,肌醇氧化产酸能力上有差异(表 2)。此外,两株菌均对链霉素,氯霉素,四环素,卡那霉素,庆大霉素,利福平敏感,而对壮观霉素有抗性。氨苄青霉素对两株菌的抑制作用有剂量上的差异,10 mg/mL 氨苄青霉素对 WT00C 无抑制作用,但对 WT00F 有显著的抑制作用,而 30 mg/mL 氨苄青霉素对两者均有抑制作用。

3 讨论

使用标准的内生菌分离方法,分别从健康茶叶叶片中分离获得两株编号为 WT00C 和 WT00F 菌株。在 NCBI 数据库 BLAST 搜索,两者与搜索出的草螺菌 16S rDNA 序列显示 99% 相似度,提示两个菌株可能为草螺菌属的成员。进一步利用 CLUSTAL_X 进行多重序列比对,分离的两个菌株与已鉴定并报道的 13 种草螺菌的 16S rDNA 高度同源,相似度高达 99%。除不能利用丙酸盐外,WT00C 和 WT00F 菌株与伯杰氏手册^[1]中草螺菌属细菌碳源利用情况一致。结合细菌形态特性、16S rDNA 同源性和生理生化指标,WT00C 和 WT00F 菌株应为草螺菌属的细菌。

基于 16S rDNA 构建的系统进化树显示 WT00C 与 WT00F 的遗传进化距离最近,同处一个最小的独立分支,但与最早鉴定的织片草螺菌(*H. seropedicae*)呈现明显的遗传进化关系。系统进化分析的结果也表明 WT00C 和 WT00F 菌株应为草螺菌属的细菌。与其它已鉴定的 13 种草螺菌分别处在不同的遗传进化分支内,提示 WT00C 和 WT00F 菌株与其它草螺菌保持着一定的遗传进化距离,两株细菌的生理生化特征与已报道的 13 个草螺菌存着明显可见的差异(表 1)。在系统进化树中,WT00C 和 WT00F 菌株与 *H. aquaticum* 和 *H. huttense* 亲缘关系较近,但它们的微生物学特性存在明显的差异,如前两者都是从茶叶叶片中分离出来,能还原硝酸盐、利用 D-甘露糖和 L-鼠李糖但不能利用 L-海藻糖作唯一的碳源且具有 β -半乳糖苷酶活性,而后两者则是从水体中分离出来,不能还原硝酸盐、不能利用 D-甘露糖和 L-鼠李糖却利用 L-海藻糖作唯一的碳源,并且无 β -半乳糖苷酶活性。就微生物特性而言,WT00C 和 WT00F 菌株更接近那些从植物中分离的草螺菌(见表 1)。由于草螺菌属是新近成立的一个属,属内细菌种类不多且生态学分布与生理功能呈现明显的多样性,通常主要利用核酸的同源性来确定种属的分类地位^[12],种与种之间的界线并不十分明晰。尽管 WT00C 和 WT00F 菌株在属内系统进化树中独立成为一个分支,其生理生化特征与已报道的 13 个草螺菌存在差异,但要精确地确定两者为草螺菌属的一个新种仍需更多的证据,或许还需

表 1. WT00C 和 WT00F 与已鉴定的 13 种草螺菌的细菌学特征比较

Table 1. Comparison of bacteriologic properties between two isolates and 13 *Herbaspirillum* species

bacterial strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	tea plant	tea plant	maize and other crops	sugar cane, sorghum	silver- grass	lima bean	soil sediments	the eutrop- hied lake	aquatic plant	spring water	wheat	rhizosphere soil of lo- groot chive	water	volcanonic soil	volcanonic soil	volcanon- ic soil
cell morphology	SCR	SCR	C-SP	SCR	SCR	CR	SCR	C-SP	CR	C-SP	SCR	SCR	CR	SCR	SCR	SCR
cell length	0.5 – 0.7	0.5 – 0.7	0.6 – 0.7	0.6 – 0.7	0.5 – 0.7	0.5	0.7	0.6 – 0.8	0.4	0.4 – 0.5	0.5 – 0.6	0.3 – 0.4	0.5	1.6	1.7	1.9
cell diameter	1.4 – 1.8	1.4 – 1.8	1.5 – 5.0	1.5 – 5.0	1.4 – 1.8	1.6	2.3	2.0 – 5.0	1.8	1.4 – 1.8	1.6 – 2.0	1.8 – 2.2	2.0	0.8	1.1	1.2
color of colonies	WH	WH	BR	WH	WH	WH	BR	C	ND	YB	ND	MWH	ND	WH	O	PO
mobility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
optimal temperature (°C)	30 – 37	30 – 37	34	25 – 30	30 – 37	28	30	28	25 – 30	25 – 37	26 – 34	25 – 30	25 – 30	28	28	28
growth at 37°C	+	+	+	+	+	ND	+	-	ND	+	ND	-	-	-	-	W
optimal pH	5 – 8	5 – 8	5 – 8	6. . 7 – 6. . . 8	6 – 7	5 – . 8.	6 – 8	5 – 8	7	6 – 7	6 – 8	6.5 – 7.5	5 – 8	6 – 8	6.0 – 8.0	6.0 – 8.0
nitrate reduction	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	-
urease (72h)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	+	+	-	-	-
sculin hydrolyzation	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-	ND	-	-	+	-	-
peroxidase	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
carbon sourceutilization:																
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	v	+	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	-	-	-	W	-	+	+	-	-	-
L-Rhamnose	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	+	+	+	+	+	ND	-	ND	+	+	ND	+	+	-	W	-
L-Fucose	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
maltose	w	w	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
mannitol	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
sorbitol	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	W	+	+	-	-
salicin	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	-	-	-	+	-
β – galactosidase	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	-	-
alkaline phosphatase	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	w	-	ND	+	+	+
<i>nif</i> H	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Tween hydrolyzeation:																
Tween 40	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND
Tween 80	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	ND	-	W	W

1: WT00C; 2: WT00F; 3: *H. seropedicae*; 4: *H. rubrisubalbicans*; 5: *H. frisingense*; 6: *H. lusitanum*; 7: *H. chlorophenicum*; 8: *H. autotrophicum*; 9: *H. huttiense* subsp. *huttiense*; 10: *H. huttiens* esubsp. *putei*; 11: *H. hiltneri*; 12: *H. rhizosphaerae*; 13: *H. aquaticum*; 14: *H. canariense* sp. nov. SUEMI03^T; 15: *H. aurantiacum* sp. nov. SUEMI08^T; 16: *H. soli* sp. nov. SUEMI10^T.

+: Positive; -: negative; V: variable; W: weak; ND: no data available; C-- -SP: curved to spiral; CR: curved rod; R: rod; SCR: slightly curved rod; BR: Brownish; C: cream; MWH: milky white; O: orange; PO: pale orange; WH: white; YB: yellow-brown. Data taken in the list came from the references 9 – 11.

表 2. 两株茶树内生菌利用碳源产酸的比较

Table 2. A comparison on acid-production using different carbohydrates as unique carbon source between the strains WT00C and WT00F

carbon source	WT00C	WT00F
D-Glucose	+	+
D-Fuctose	+	w
Glycerol	+	w
D/ L-Arabinose	+	+
D-Ribose	+	+
xylose	+	+
xylitol	+	+
D-Mannose	w	w
mannitol	w	+
sorbose	w	w
sorbitol	+	+
maltose	-	-
sucrose	-	-
glycogen	-	-
trehalose	-	-
D-Raffinose	-	-
cellobiose	-	-
lactose	-	+
D-Galactose	+	+
galactitol	-	-
inositol	+	w
N-acetylglucosamin	-	-
erythritol	-	-

要进行基因组 DNA 成分分析和脂肪酸成分鉴定等。不过,99.7% 16S rDNA 同源性表明 WT00C 和 WT00F 菌株有着最近的亲缘关系,两者的分离源相同、形态特征和生理生化特征基本类似,最主要的区别是 WT00C 菌株具有过氧化氢酶活性和对低浓度氨基青霉素(10 mg/mL)表现抗性而 WT00F 则无过氧化氢酶活性并对氨基青霉素敏感,两者之间利用碳源产酸也有区别(见表 2)。综合 16S rDNA 序列分析和生理生化特征,推测 WT00C 和 WT00F 菌株可能为草螺菌属中同一个种内不同的生理变种或品系。

茶叶是我国重要的经济作物,2012 年种植面积达 3170 万亩,年产量 162.3 万吨,占全球 37.8%,无论种植面积或产量都居世界第一。茶叶除了作为饮品外,开发茶叶有效成分并用于医药、食品、化工已成为新的发展方向。因此,提高茶叶产量、改良茶叶品质、开展绿色生物防治就显得十分重要。草螺菌为内生菌,大多不致病或为温和致病菌。大多数草螺菌具有固氮或产生植物激素的功能,给高粱和水稻接种织片草螺菌(*H. seropedicae*),明显提高作物的产量^[17]。WT00C 和 WT00F 草螺菌是从健康茶树叶片中分离获得,茶树叶片未见明显的病变症状,

它们应不是茶树的严重致病菌。此外,两个菌株都能在实验室培养,并能有效地产生促进植物生长发育的 IAA、NH₄⁺ 和嗜铁载体。因此,这两个草螺菌菌株具备了用于茶叶产量提高、品质改良或绿色生防的潜在条件。后续研究工作将主要集中在茶树草螺菌与茶树相互作用和分子生物学改造方面,探索茶树草螺菌与茶叶次生代谢产物的关系、与茶树生长发育、茶叶产量与品质的关系以及探寻茶树草螺菌用于茶树绿色生防的可行性。

参考文献

- [1] Baldani JI, Baldani VLD, Seldin L, Döbereiner J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1986, 36 (1): 86-93.
- [2] Baldani JI, Pot B, Kirchoff G, Falsen E, Baldani VLD, Olivares FL, Hoste B, Kersters K, Hartmann A, Gillis M, Döbereiner J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46 (3): 802-810.
- [3] Kirchoff G, Eckert B, Stoffels M, Baldani JI, Reis VM, Hartmann A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 2001, 51 (1): 157-168.
- [4] Valverde A, Velazquez E, Gutierrez C, Cervantes E, Ventosa A, Igual JM. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 2003, 53 (6): 1979-1983.
- [5] Im WT, Bae HS, Yokota A, Lee ST. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 2004, 54 (3): 851-855.
- [6] Ding L, Yokota A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of *Pseudomonas huttiensis*, *Pseudomonas lanceolata*, *Aquaspirillum delicatum* and *Aquaspirillum autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus*

- comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54 (6) : 2223-2230.
- [7] Rothballer M, Schmid M, Klein I, Gattinger A, Grundmann S, Hartmann A. *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56 (6) : 1341-1348.
- [8] Jung SY, Lee MH, Oh TK, Yoon JH. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57 (10) : 2284-2288.
- [9] Dobritsa AP, Reddy MC, Samadpour M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60 (6) : 1418-1426.
- [10] Carro L, Rivas R, Leon-Barrios M, Gonzalez-Tirante M, Velazquez E, Valverde A. *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., isolated from volcanic mountain soil, and emended description of the genus *Herbaspirillum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62 (6) : 1300-1306.
- [11] Garrity, George M, Julia A, Bell, Timothy L. *Bergey's Manual* © of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria (Part C). 2nd eds. Verlag: Springer, 2005: 629-636.
- [12] Schmid M, Baldani JI, Hartmann A. The Genus *Herbaspirillum*. *Prokaryotes*, 2006, 5: 141-150.
- [13] Magalhaes Cruz L, de Souza EM, Weber OB, Baldani JI, Döbereiner J, Pedrosa Fde O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67 (5) : 2375-2379.
- [14] Olivares FL, Baldani VLD, Reis VM, Baldani JI, Döbereiner J. Occurrence of endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*, 1996, 21 (1) : 197-200.
- [15] Baldani JI, Baldani VL. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 2005, 77 (3) : 549-579.
- [16] Rothballer M, Eckert B, Schmid M, Fekete A, Schloter M, Lehner A, Pollmann S, Hartmann A. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 66 (1) : 85-95.
- [17] James EK, Olivares FL, Baldani JI, Döbereiner J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue of *Sorghum bicolor* L. Moench *Journal of Experimental Botany*, 1997, 48 (1) : 785-798.
- [18] Michael J, Tan MD, Richard L, Oehler MD. Lower extremity cellulitis and bacteremia with *Herbaspirillum seropedicae* associated with aquatic exposure in a patient with cirrhosis. *Infectious Diseases Clinical Practice*, 2005, 13 (5) : 277-279.
- [19] Spilker T, Uluer AZ, Marty FM, Yeh WW, Levison JH, Vandamme P, Lipuma JJ. Recovery of *Herbaspirillum* species from persons with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46 (8) : 2774-2777.
- [20] Zhai W, Yu J, Yu X, Wu C, Chen J. The identification of *Herbaspirillum* in blood from patients with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2010, 25 (4) : 52-54. (in Chinese)
翟文琴, 虞健人, 俞小丽, 吴朝阳, 陈建国. 急性淋巴细胞白血病患者血液中草螺菌的鉴定. 现代检验医学杂志, 2010, 25 (4) : 52-54.
- [21] Song P, Li F, Ma L. The identification and phylogenetic analysis of endophytic bacteria from *Davidia involucreta* Baill. *Microbiology China*, 2011, 38 (1) : 8-13. (in Chinese)
宋培勇, 李风华, 马莉莉. 珙桐内生细菌的分离鉴定及系统发育分析. 微生物学通报, 2011, 38 (1) : 8-13.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第二版, 北京: 科学出版社. 2001:353-363.
- [23] Brick JM, Bostock RM, Silverstone SE. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57 (2) : 535-538.
- [24] Gour AC. Physiological functions of phosphate solubilizing micro-organisms//Gour AC. ed. *Phosphate Solubilizing Micro-organisms as Biofertilizers*. New Delhi: Omega scientific, 1990: 16-72.
- [25] Cappuccino JC, Sherman N. *Microbiology: a Laboratory Manual*. 3rd eds. New York: Benjamin / Cummings Pub

- Co, 1992: 125-179.
- [26] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160: 47-56.
- [27] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL _ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24) : 4876-4882.
- [28] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24 (8) : 1596-1599.
- [29] Döbereiner J, Day JM. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*, 1976, 2 (1) : 518-538.
- [30] Stoltzfus JR, So R, Malarvithi PP, Ladha JK, de Bruijn FJ. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil*, 1997, 194 (3) : 25-36.
- [31] Poly F, Monrozier LJ, Bally R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 2001, 152 (1) : 95-103.
- [32] Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57 (10) : 2259-2261.

Microbiological properties of two endophytic bacteria isolated from tea (*Camellia sinensis* L.)

Ting Wang, Sheng Yang, Yaxue Chen, Lingling Hu, Qing Tu, Li Zhang, Xueqing Liu, Xingguo Wang*

Faculty of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] We investigated biological activities, physiological and biochemical properties of two endophytic bacteria isolated from fresh leaves of tea plants. [Method] We did morphological observation, biological activity test, physiological and biochemical assays, 16S rDNA analysis, and compared their genotype and phenotype with those of 13 *Herbaspirillum* species. [Results] Their colonies were round, opaque, central uplift and regular edge with a milky white color. Their cells were Gram-negative, rod-shaped with the size of (0.5 - 0.7) μm \times (1.4 - 1.8) μm and flagellers, but without spore. Both isolates produced indole-3-acetic acid (IAA) (18.7 mg/L for WT00C and 24.9 mg/L for WT00F), ammonia and siderophores, but no nitrogen-fixing activity. The 16S rDNA had sequences similarities of 99.7% each other and 99% with 13 *Herbaspirillum* species. Two isolates used carbon source as described in the genus *Herbaspirillum*, except for propionate salt. The neighbor-joining tree built using the 16S rDNA showed that two isolates formed an independent group, which kept certain genetic distance from the 13 *Herbaspirillum* species. Their physiological and biochemical characteristics and genotypes were different from those for 13 *Herbaspirillum* species. [Conclusion] Two isolates WT00C and WT00F were classified as novel members in the genus *Herbaspirillum*.

Keywords: *Herbaspirillum* in tea plant, Endophytic bacterium, bacterial classification

(本文责编:张晓丽)