

明永冰川低温细菌分离鉴定及生物学特性

赵晓曼, 周长涛, 魏云林, 季秀玲*

(昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 对明永冰川冰舌地区的细菌进行分离培养和鉴定。通过土壤悬浮涂布法和平板划线法分离纯化细菌, 并做生理生化特性、16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析。从明永冰川地区分离纯化出 22 株可培细菌, 16S rRNA 基因序列分析结果表明: 菌株 MY0504 与黄杆菌属梭菌 (*Flavobacterium pectinovorum*) 亲缘关系最近 (97.6%); 菌株 MY1413 和 MY14015 分别与 *Arthrobacter psychrophenicus* 和 *Arthrobacter parietes* 有很近的亲缘关系 (98%); MY14011 与河流色杆菌 (*Chromobacterium fluviatile*) 进化关系最近 (97%), 其余 18 株菌均鉴定为假单胞菌属的菌株 (*Pseudomonas* spp.)。作者对该地区微生物资源进行初步探究, 为了解冰川低温微生物多样性提供参考。

关键词: 冰川; 低温细菌; 16S rRNA; 分离鉴定

中图分类号: Q 938 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)12-1261-05

Isolation, Identification and Characterization of Cold-Adapted Bacteria from Mingyong Glacier

ZHAO Xiaoman, ZHOU Changtao, WEI Yunlin, JI Xiuling*

(Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: We screened and identified the cold-adapted bacteria from Mingyong glacier. The bacterial strains were isolated and purified by the soil suspension coating and spread plate methods. Based on physiological and biochemical properties, homology and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences, all isolates were classified. In total 22 bacterial strains were isolated, based on the 16S rRNA gene sequence analysis: MY0504 strain was most closely related to *Flavobacterium pectinovorum* with 97.6%, MY1413 and MY14015 strains were most closely related to *Arthrobacter psychrophenicus* and *A. parietes* with 98%, while MY14011 strain was most closely related to *Chromobacterium fluviatile* with 97%, and other 18 strains of bacteria were identified as *Pseudomonas* spp. The research is preliminary exploration on the microbiological resources in

收稿日期: 2015-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31700324; 31860147)。

* 通信作者: 季秀玲(1980—), 女, 蒙古族, 内蒙古赤峰人, 工学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事嗜极微生物方面的研究。

E-mail: jixiuling@126.com

引用本文: 赵晓曼, 周长涛, 魏云林, 等. 明永冰川低温细菌分离鉴定及生物学特性研究[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(12): 1261-1265.

Mingyong glacier, and provides reference information for further studies in this area.

Keywords: glacier, cold-adapted bacteria, 16S rRNA, isolation and identification

地球表面生物圈中超过 80% 的区域温度均低于 5 °C, 海洋的大部分区域其水温低于 5 °C^[1]; 而在南北两极平均温度仅为 -1.8 °C, 绝大多数土壤的温度即使在夏季也不会超过 10 °C^[2]。这些低温环境中生存着大量低温微生物, 冷适应细菌在低温条件下的生存能力使得它们在生态学方面比嗜温菌更有优势^[3], 冰川被认为是研究宇宙生命进化和地球环境演化等重大问题的“活化石”, 同时也是一个多元化和动态的微生物“储藏库”。国内外冰川细菌研究方向主要为: 新种的发现^[4]、适冷机制^[5]、固氮机制^[6]和冰川细菌相关产物如抗冻蛋白、低温酶等^[7]。可以说冰川微生物的研究只处于起始阶段, 还有很长的路要走。然而据 2010 年世界冰川监测机构关于冰川融化的最新评估显示, 冰川消融速度是 2000 年的 2 倍, 冰川中独特而稀有的微生物菌种可能在未被人类初识前就因冰川消融濒危^[8]。本研究对明永冰川低温微生物多样性的初步研究获得了一批重要的菌种资源, 为寻找有应用价值的产低温酶菌株、了解该地区低温微生物多样性奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 培养基

LB 固体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, 琼脂 20; pH 7.2。

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10; pH 7.2。

营养肉汁琼脂(g/L): 蛋白胨 5, 牛肉膏 1, NaCl 5, 琼脂 15; pH 7.0~7.2。

基础培养基(g/L): 葡萄糖 5, (NH₄)SO₄ 2, 柠檬酸钠 1, K₂HPO₄·3H₂O 14, KH₂PO₄ 6, 琼脂 20; pH 7.0。

1.2 样品采集和低温细菌的分离及形态学特征观察

1.2.1 样品采集和低温细菌的筛选与分离 本研究样品采样点位于云南省明永冰川(N28°27', E98°48')。在实验室准备好固体培养基带到明永冰川。在明永冰川的冰舌地区采集冰、冰川退却地区土壤、融冰水、冰片和少量土壤尘埃混合样, 共 15 份样

品, 每个平板均匀的铺洒约 0.1 g 样品后立即用封口膜密封。所有的样品在被运回实验室之前都置于 4~8 °C 保存。回到实验室后, 土样用土壤悬浮涂布法筛选分离: 称取少量土样于灭菌三角瓶中, 加入约 100 倍于土样质量的无菌水, 取土壤稀释液涂布 LB 平板。水样、冰样直接平板划线, 后均置于 13 °C 培养一周, 培养物经过三次划线分离纯化, 并观察菌落形态。

1.2.2 运动性观察 在洁净载玻片上加一滴无菌水, 挑取一环菌液与水混合, 再加一环 0.01% 的美蓝水溶液与其混合均匀。用镊子取一洁净盖玻片, 使其一边与菌液边缘接触, 然后将盖玻片慢慢放下盖在菌液上, 在显微镜下观察, 发现两个细菌之间出现明显的位移的为阳性, 否则为阴性。

1.3 菌株的生理生化特性研究

1.3.1 菌株生长温度范围 22 株菌株使用 4、15、25、37 °C 四个温度梯度, 培养 48 h 后以未接种的新鲜培养基做阴性对照, 然后测光吸收度 OD₆₀₀, 重复 3 次。

1.3.2 抗生素抗性实验 接种 10 μL 新鲜培养的菌液于含不同质量浓度(氨苄青霉素 50 μg/mL; 卡那霉素 50 μg/mL; 庆大霉素 7 μg/mL; 四环素 10 μg/mL) 抗生素的 5 mL LB 液体培养基中, pH 7.0, 于 13 °C、150 r/min 培养 36 h, 观察菌株对抗生素的抗性。

1.3.3 对不同底物的分解能力 挑取单菌落接种于选择性橄榄油, 干酪素和淀粉培养基上, 于 15 °C 培养 48 h 后观察降解情况。

1.3.4 氧化酶实验 用滤纸沾取菌落, 滴一滴 1% 的对氨基二甲基苯胺盐酸盐, 呈粉红色, 再滴加一滴 5% 的 α-萘酚溶液, 若在 30 s 变成蓝色, 为阳性反应, 若在 2 min 内不变蓝色, 则为阴性反应。

1.4 16S rRNA 的 PCR 扩增

利用 16S rRNA 基因的一对通用引物进行 PCR 扩增。引物: F 5'-AGAGTTTGATCCTGGTCAG-3' 和 R 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' 由英俊生物技术有限公司合成。PCR 反应体系(50 μL): 10×Ex-Taq buffer 5 μL, 2.5 mmol/l dNTP 3 μL, 模板 10

ng,正向引物各 50 pmol, *Ex-Taq* DNA polymerase 0.2 μ L, 无菌水补足至 50 μ L。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.5 DNA 序列测定和系统发育树的构建

DNA 产物纯化后,与 pMD19-T 载体(Takara) 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,取 10 μ L 连接产物转化感受态细胞 DH5 α 。以 M₁₃(RV/M₄)为引物(北京三博远志公司合成)检测转化产物。PCR 扩增验证的产物由北京三博远志公司测序部进行双向测序,然后将所测序列提交 GenBank,通过 Blast(Ver2.2.14)进行序列同源性检索分析。选取同源性比较高的典型菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象,然后用 CLUSTAL X 软件^[9]进行多序列比对并计算供试菌株与参比菌株之间的序列相似性,采用邻位相接法(Neighbor-Joining),应用 MEGA 6.1 软件构建系统进化树^[9]。

2 结果与讨论

2.1 细菌分离纯化结果

作者分离纯化到 500 多株细菌,通过菌形态、颜色等选出 22 株细菌做进一步的研究,22 株细菌编号、菌落及菌体形态特征见表 1。

表 1 菌株编号、菌落及菌体形态特征

Table 1 Strains number,colony and cell morphology characteristics

编号	样品来源	形态学特征
14011	冰川混合样	菌落蓝紫色奶酪状;菌体杆状有运动性
14015	冰川混合样	菌落白色圆整光滑;菌体球-杆状有运动性
1402	冰川混合样	菌落乳白色圆整光滑;菌体杆状有运动性
1403	冰川混合样	菌落白色圆整光滑;菌体杆状有运动性
1404	冰川混合样	菌落白色圆整光滑;菌体杆状有运动性
1102	冰泉水样	菌落白色圆整;菌体杆状有运动性
1103	冰泉水样	菌落白色圆整粗糙;菌体杆状有运动性
1104	冰泉水样	菌落白色缺刻较粗糙;菌体杆状有运动性
1105	冰泉水样	菌落白色圆整;菌体杆状有运动性
1106	冰泉水样	菌落白色粗糙有缺刻;菌体杆状有运动性
1412	近冰泥样	菌落白色圆整半透明;菌体杆状有运动性
1413	近冰泥样	菌落黄色有缺刻;菌体球-杆状有运动性
1416	冰川黑泥样	菌落乳白色圆整光滑;菌体杆状有运动性
1418	风堆土样	菌落白色圆整光滑;菌体杆状有运动性
1420	风堆土样	菌落白色较圆整;菌体杆状有运动性
0501	冰川冰样	菌落白色较圆整;菌体杆状有运动性
0502	冰川冰样	菌落白色浅粉较圆整;菌体杆状有运动性
0503	冰川冰样	菌落白色圆整;菌体杆状有运动性

编号	样品来源	形态学特征
0504	冰川冰样	菌落黄色较圆整;菌体直杆状没有运动性
0506	冰川冰样	菌落白色微粉较圆整;菌体杆状有运动性
0507	冰川冰样	菌落白色圆整;菌体杆状有运动性
0508	冰川冰样	菌落白色圆整;菌体杆状有运动性

2.2 菌株生理生化特性

22 株菌在 4、15、25 $^{\circ}$ C 几乎均能生长,37 $^{\circ}$ C 时仅一株菌能生长,判定菌株 MY14011 属于嗜冷菌,其余 21 株菌属于耐冷菌;所有菌株均有氨苄青霉素抗性,对卡那霉素和四环素敏感,部分对庆大霉素敏感;22 株菌均无淀粉酶和脂肪酶活性,多数菌株有蛋白酶水解活性;大部分菌株氧化酶反应呈阳性,见表 2。

表 2 22 株细菌生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical properties of 22 strains

菌株编号	菌株生长温度/ $^{\circ}$ C				抗生素抗性				底物分解能力			
	4	15	25	37	氨苄青霉素	卡那霉素	四环素	庆大霉素	淀粉酶	脂肪酶	蛋白酶	氧化酶
14011	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
14015	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1402	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
1403	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
1404	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
1102	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
1103	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
1104	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
1105	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
1106	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
1412	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
1413	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1416	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
1418	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
1420	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
0501	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
0502	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
0503	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
0504	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
0506	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
0507	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
0508	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+

注:“+”阳性;“-”阴性

2.3 分子鉴定结果

分离菌株 PCR 扩增出的 16S rDNA 片断条带单一, 大小约为 1 500 bp, 连接 pMD19-T 载体, 测序后提交 NCBI, 通过 Blast (Ver2.2.14) 比对进行分离菌株的初步鉴定。将所得菌株序列与 GenBank 中相关序列进行同源性检索分析, 并选取同源性高的菌株利用 ClustX 和 Mega 软件构建系统发育树, 见图 1。

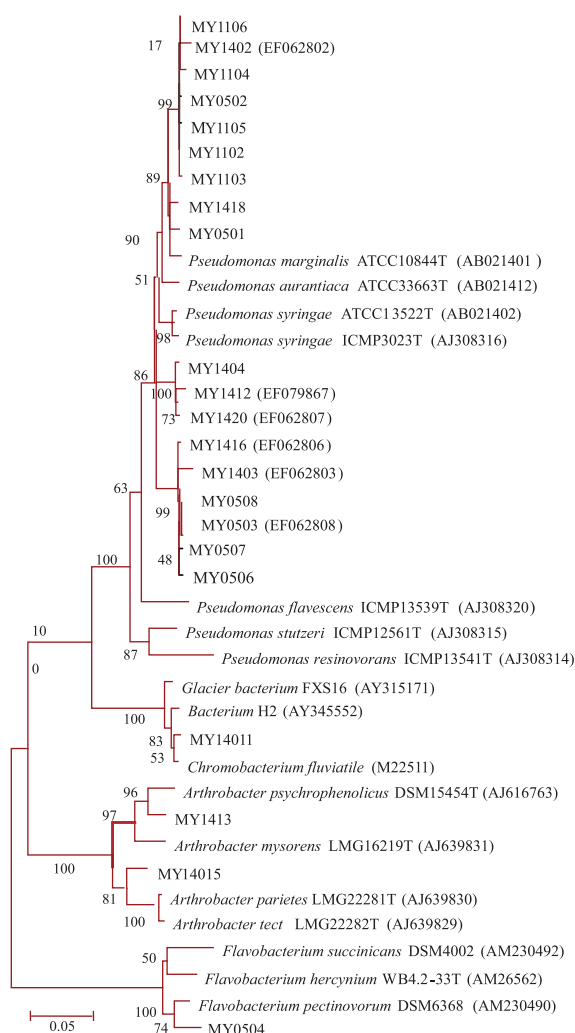


图 1 22 株菌与相关菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the 22 strains and their relatives

22 株菌在进化树上分布在四个簇群中, 其中菌株 MY14011 与 *Chromobacterium fluviatile* 的同源性最高; 菌株 MY0504 与 *Flavobacterium* 属的亲缘关系最近; 菌株 MY14015 和 MY1413 与 *Arthrobacter* 属划分在同一簇群中; 其余的 18 株菌株均归属于

Pseudomonas 属。

作者采用传统的微生物分离纯化法从明永冰川冰舌地区分离纯化获得 22 株可培细菌。根据 16S rRNA 基因序列分析、系统进化分析和部分生理生化特性结果表明: 菌株 MY0504 与 *Flavobacterium pectinovorum* DSM6368 (AM230490) 亲缘关系最近 (97.6%), 具有蛋白酶活性和氨苄抗性; 菌株 MY1413 和 MY14015 分别与 *Arthrobacter psychrophilicus* DSM1545T (AJ616763) 和 *Arthrobacter parietes* LMG22281T (AJ639830) 有很近的亲缘关系 (98%), 具有氨苄抗性; MY14011 归属于色杆菌属, 与河流色杆菌 *Chromobacterium fluviatile* 进化关系最近 (97%), 具有蛋白酶活性和氨苄抗性, 可能为潜在新种, 但需要进一步做分子杂交实验验证; 其余 18 株菌均鉴定为假单胞菌属的菌株。

低温环境中细菌是数量和种类最多, 目前从低温环境中分离得的微生物大多为耐冷菌, 嗜冷菌所占比例较小, 其中属于革兰氏阴性的 *Pseudomonas* 属和革兰氏阳性的 *Bacillus* 属较多^[10]。和天山一号冰川类似^[11], 在分离的 22 株菌种明永冰川假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 属于的优势菌株。黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 广泛分布于土壤、淡水、海洋和极地环境中^[12], 因其生长环境多样, 具较高的蛋白酶活性, 将为商品蛋白酶的开发利用提供有力的菌种资源库^[7]。从 2003 年到 2013 年, 周培瑾和周宇光团队在中国 1 号冰川和海螺沟冰川分离出了 *Flavobacterium* 属的 7 个新种^[13]。外籍华人 Dechao Zhang 从中国一号冰川分离到的 *Flavobacterium* 属的一个新种^[14]。作者也从明永冰川分离到一株黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 的菌株 MY0504。迄今尚没有有在冰川地区分离到 *Chromobacterium* 的相关报道, 分析原因可能是, 河流色杆菌是一种在亚热带和热带地区的水与土壤中存在的革兰氏阴性杆菌, 明永冰川独特的低纬度热带季风气候和靠降水而生存的特点, 使得能在冰川中分离到 *Chromobacterium* 属细菌, 这为进一步研究冰川这一特殊区域的微生物与气候环境变化的关系提供了方向。

3 结 语

研究明永冰川这一特殊生态环境下的低温微生物多样性, 不仅有助于了解这一特殊地理条件及

生态环境下的微生物群落演替规律,而且也对了解微生物—植被—土壤这一系统对全球气候变化的影响有极其重要的理论意义^[15]。当下酶制剂产业发

展前景广阔,对低温酶的开发和利用具有潜在的经济价值^[16]。

参考文献:

- [1] LI Jing, WANG Jihua, CUI Di. The research of the psychophiles in cold germ mechanism[J]. **Harbin Normal University Journal of Natural**, 2007, 23(5): 281-284. (in Chinese)
- [2] MARGESIN R, SCHINNER F. Properties of cold-adapted microorganisms and their potential role in biotechnology[J]. **Journal of Biotechnology**, 1994, 33: 1-14.
- [3] MORITA RY. Psychrophilic bacteria[J]. **Bacteriol Rev**, 1975, 39(2): 144-167.
- [4] SCHUMANN P, ZHANG D, REDZIC M, et al. *Alpinimonas psychrophilagen*. Nov, sp. Nov, an actinobacterium of the family Microbacteriaceae isolated from alpine glacier cryoconite[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2012, 62(11): 2724-2730.
- [5] ANTONYA R, KRISHNANA K P, LALURAJA C M, et al. Diversity and physiology of culturable bacteria associated with a coastal Antarctic ice core[J]. **Microbiological Research**, 2012, 167: 372-380.
- [6] DEEP C S, AMIT Y, REETA G, et al. Differential proteomics in response to low temperature diazotrophy of himalayan psychrophilic nitrogen fixing pseudomonas migulae S10724 strain[J]. **Curr Microbiol**, 2014, 68: 543-550.
- [7] KUDDUS M, ROOHI, SAIMA, et al. Cold-active extracellular α -amylase production from novel bacteria *Microbacterium foliorum* GA2 and *Bacillus cereus* GA6 isolated from Gangotri glacier, Western Himalaya[J]. **Journal of Genetic Engineering, and Biotechnology**, 2012, 10(1): 151-159.
- [8] ZHANG Shuhong, HOU Shugui, QING Xiang. Progress in research on resources of glacial microbiology[J]. **Environmental Science and Technology**, 2014, 37(12): 62-67. (in Chinese)
- [9] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. **Nucleic Acids Research**, 1997, 24: 4876-4882. (in Chinese)
- [10] GU Yunfu, ZHENG Youkun, Petri Penttinen, et al. Phylogeny of psychrophilic bacteria from peat swamp soil in zoigê plateau[J]. **Wetland Science**, 2014, 12(5): 631-637. (in Chinese)
- [11] FANG Shijie, CHANG Wei, WANG Wei, et al. Preliminary studies on diversity of *Psychrotolerant Bacteria* in kanas lake spot and NO.1 glacier in Xinjiang[J]. **Agricultural science of Xinjiang**, 2009, 46(1): 59-62. (in Chinese)
- [12] BERNARDET J F, BRUUN B, HUGO C. The Genera, *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*[M]. New York: Springer, 2006: 638-676.
- [13] BACH E, DAROIT DJ, CORREA A P, et al. Production and properties of keratinolytic proteases from three novel gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils[J]. **Biodegradation**, 2011, 22(6): 1191-1201.
- [14] ZHANG D, WANG H, LIU H, et al. *Flavobacterium glaciei* sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the China No. 1 glacier[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2006, 56(12): 2921-2925.
- [15] TANG Bing, TANG Xiaofeng, PENG Zhenrong. Advance in psychrophiles study[J]. **Journal of Microbiology**, 2002, 22(1): 51-53. (in Chinese)
- [16] CHEN Jian, LIU Long, DU Guocheng. Current status and prospects of enzyme preparation industry[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2012, 31(1): 1-7. (in Chinese)