

# 天山冻土中嗜冷酵母菌生物多样性

姜远丽<sup>1</sup>, 郑晓吉<sup>1</sup>, 史学伟<sup>1</sup>, 倪永清<sup>\*1</sup>

(石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000)

**摘要:** 采用麦芽浸膏富集平板涂布天山冻土中可培养酵母菌, 通过麦芽浸膏分离培养基筛选菌株。采用酵母菌常规生理生化实验、最适生长温度、最适 pH 对分离菌株的生理学进行研究。以 NL1 和 NL4 为 PCR 扩增引物, 通过 26S rRNA 基因 D1/D2 区序列同源性分析, 初步确定酵母菌株的系统进化地位。分离筛选到 4 株嗜低温酵母菌, 分属于隐球酵母 (*Cystofilobasidium infirmominiatum*)、掷孢酵母 (*Sporobolomyces patagonicus*)、棒孢酵母 (*Clavispora lusitaniae*) 和毕赤酵母 (*Pichia kluyveri*)。

**关键词:** 天山冻土; 嗜冷酵母菌; 26S rDNA; 多样性

**中图分类号:** TS 261.11 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2012)12—1289—06

## Diversity of Psychrotrophic Yeast from Permafrost Soil at the Terminus of a Glacier in the Tianshan Mountains

JIANG Yuan-li<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-ji<sup>1</sup>, SHI Xue-wei<sup>1</sup>, NI Yong-qing<sup>\*1</sup>

(Food college, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**Abstract:** The objective of this study was to investigate the diversity of culturable yeast strains from permafrost soils at the terminus of a glacier in the Tianshan Mountains was investigated. Isolation and molecular phylogenetic analysis were performed in order to expand our knowledge on diversity of psychrotrophic and psychrophilic yeast. In addition, efforts focused on screening for psychrophilic yeast. Psychrophilic yeast strains were detected on YEPG plates, respectively. Identity and genetic diversity of strains isolated was determined by 26S rRNA gene D1/D2 by the forward primers NL1 and the reverse NL4. The physiological tests were carried out to determine the phenotypic differences between strains showing high similarity of 26S rRNA gene sequences. In all, 4 yeast strains was isolated by 26S rRNA gene D1/D2 and internal transcribed spacers of 4 genera (*Cryptococcus*, *Sporobolomyces*, *Clavispora*, *Pichia*). The results enrich our knowledge on the differences of psychrotrophic yeast diversity between the glacier under study and other worldwide cold habitats are also discussed.

**Keywords:** alpine permafrost, psychrotrophic yeast, 26S rDNA, diversity

收稿日期: 2012-03-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(40961002 / D010104); 石河子大学科学技术研究发展计划项目(ZRKXYB-LH18)。

\* 通信作者: 倪永清(1969—), 男, 甘肃武威人, 工学博士, 副教授, 博士研究生导师, 主要从事环境微生物方面的研究。

E-mail: niyqlzu@sina.com

目前, 极端微生物已成为国际研究的热门领域, 随着极端微生物的深入研究, 冻土微生物的研究引起了人们的关注。冻土环境中微生物产生了一系列适应低温、寡营养、强辐射、冻融等极端因子的分子机制。研究其数量、生理生化特性以及遗传多样性, 对于揭示生命起源的奥秘, 阐明生物多样性形成的机制, 认识生命的极限及其与环境的相互作用的规律等, 都具有极为重要的科学意义。

国外从南极冰川中分离酵母菌的研究较多, Connell L 和 Redman R 从南极冰川中分离可培养的嗜低温酵母菌并对其多样性进行了研究。用加氯霉素的 YPD 培养基培养所得酵母菌, 通过 DNA 提取, 用 5.8 sDNA 基因测序, 对所分离的酵母进行鉴定, 证明土壤中的 pH 和电导率是影响土壤酵母菌的主要因素<sup>[3]</sup>。Akbar Ali Khan Pathan 和 Bhaskar Bhadra 从南极冰川 4 个土壤样品中分离 132 株酵母菌, 基于 D1/D2 序列进行分析, 得到 6 组均为嗜冷酵母菌, 6 组中有两组能够产低温脂肪酶、蛋白酶、果胶酶和纤维素酶。2 组嗜冷酵母 C18-1(w9C) 和 C18-2(w9, 12C) 产脂肪酸, 并对分离菌种产酶和产脂肪酸进行了分析, 温度范围 8~20 °C, 具有很好的应用前景<sup>[13]</sup>。

天山冻土属于我国高海拔高山多年冻土类型, 分布于乌鲁木齐河源天山冰川地区, 海拔 3 250 m 以上, 年平均地温为-4.95 °C, 并且随着海拔的升高, 地温降低。作者选取天山河源 1 号冰川冻土为介质, 分离筛选嗜低温酵母菌。用 26s rDNA D1/D2 区序列扩增及检测, 根据同源性序列来对待测酵母进行分类, 并构建系统发育树。常规分离培养技术是研究微生物种群结构不可缺少的手段。近年来, 分子生物学技术的发展使微生态学研究从可培养技术转向了非培养分析法。这种方法由于不需要培养微生物就能有效分析复杂微生物群落的多样性而越来越受到重视<sup>[15]</sup>。虽然非培养分析法为研究和揭示微生物多样性而得到极大的拓展, 但是要真正实现微生物的生物技术潜力, 仍需要得到它们的纯培养物, 因此传统分离培养工作仍然是研究微生物多样性不可缺少的手段<sup>[19]</sup>。研究天山冻土中酵母菌数量生理生化特性、生物多样性对于进一步阐明生物多样性形成的机制具有重要的科学意义。另外嗜低温酵母菌产多不饱和脂肪酸、低温酶以及产类胡萝卜素特性, 在食品、纺织、医药等多个领域中具有

很好的开发应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

冻土样品于 2010 年 9 月采自天山一号冰川西支的冰川尾部, 海拔 3 833 m (43°07.125N, 86°48.707E)。沿 3.3 m 深的冻土剖面每隔 20 cm 取样, 然后将冻土样品迅速装入已灭菌的保鲜盒内, 置于车载冰箱中保存。运回实验室后, 在超净工作台上削去表层可能受到污染的样品, 于-20 °C 保存备用。用标准 pH 计测定土壤浸出液 pH 值。以上所有过程均在无菌条件下完成。

### 1.2 培养基

**1.2.1 分离培养基** RB (Rose Bengal agar) + tetracycline 培养基<sup>[7]</sup>, 加入琼脂到 1.5 g/dL。

**1.2.2 液体富集培养基** YEPG (酵母提取物 10 g/L, peptone 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L)。

**1.2.3 基础培养基** YEPG (酵母提取物 10 g/L, peptone 10 g/L, 葡萄糖 20 g/L), 1.5 g/dL 琼脂。

### 1.3 菌株的分离与纯化

在无菌操作台上, 取 5 g 土样加入 50 mL 无菌水中, 加无菌玻璃珠充分振荡摇匀后静置片刻, 取 5 mL 上清液分别放入已经灭菌装有 150 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于 10 °C 恒温培养箱中培养 48~72 h, 使菌种增殖。将富集培养液采用梯度稀释平板涂布法于分离培养基上进行分离。10 °C 培养 7 d, 转接划线培养 3 次后, 根据菌落颜色、大小、形态等表型差异进行初步分离筛选并纯化, 所得纯培养物转接到 YEPG 基础斜面培养基, 4 °C 编号保藏备用。

### 1.4 菌落及菌体形态观察

取 100 μL 稀释到 10<sup>-8</sup> 的菌株发酵液涂布 YEPD 固体培养基平板, 30 °C 倒置培养 3 d, 观察菌落形态。

### 1.5 最适生长温度的测定

将 4 种酵母菌株的液体培养液按 0.5 mL 的接入量接入装有 5 mL 的 YEPD 液体富集培养基, pH 为 6.0 的试管中, 分别在 4、10、15、20、25 °C 五个温度下培养, 培养 72 h 后 420 nm 测 OD 值, 根据菌悬液浓度判断最适生长温度。

### 1.6 最适 pH 的测定

按 10% 接种体积分数将 4 种酵母菌分别接种

于pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0的7个梯度的50 mL YEPD 液体培养基中,10 ℃培养72 h后,420 nm 测 OD 值,根据菌悬液浓度判断最适生长 pH 值。

### 1.7 26S rRNA 基因 PCR 扩增和系统进化分析

将保存的4种酵母菌菌株分别接种于 YEPD 培养基中,25 ℃培养24~48 h,连续活化三代,用接种环取少量旺盛生长于 YEPD 培养基上的供试酵母细胞,悬浮于100 μL 裂解液(100 mmol/L Tris,30 mmol/L EDTA,0.5% SDS,pH 8.0)中,100 ℃水浴15 min,冷却后加入100 μL 2.5 mol/L 醋酸钾(pH 7.5),混匀,置于冰中1 h,10 000 r/min 离心10 min,取上清液,加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1),剧烈振荡后,10 000 r/min 离心10 min,上清液用等体积氯仿-异戊醇重复处理一次后加入等体积预冷的异戊醇,混匀后于-20 ℃下静置15 min,13 000 r/min 离心15 min,沉淀用100 μL 70%和无水乙醇各洗涤一次,真空抽干后加入50 μL 无菌水,溶解后-20 ℃保藏。

26S rDNA 5' 末端有一个长约600 bp 的 D1/D2 序列,采用酵母菌 26S rDNA 基因通用引物 NL1(5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') 和 NL4(5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') 扩增 26S rDNA D1/D2 区基因片段,进行 PCR 扩增<sup>[8]</sup>。PCR 产物用 EZ-10 column PCR Product Purification kit (BIO BASIC INC, Canada) 纯化后,由上海生工生物技术有限公司采用 ABI377DNA 自动测序仪上直接测序。测序结果用 Chromas 参照正反序列图谱人工校对,校正后的 26S rDNA D1/D2 区序列在 GenBank 数据库中进行同源序列搜索(BLAST),比较供试菌株与已知酵母菌相应序列的同源性。为进一步显示

实验菌株与已知酵母菌的亲缘关系及其分类地位,根据同源序列搜索结果,下载相关酵母菌菌种的 26S rDNA D1/D2 区序列,与实验菌株序列一起用 Clustal X1.83 软件进行匹配排列(align),用 MEGA 4.1 软件中的 neighbor-joining 分析法构建系统发育树,并进行1 000次 Bootstraps 检验<sup>[9]</sup>。所测得的26S rDNA 序列提交到 GenBank 数据库中,用 BLAST 进行相关序列的搜索,与 GenBank 数据库中现有的近缘菌株的序列比较,并从数据库获得相关属、相关种的 26S rDNA 序列,建立系统发育树。

## 2 结果与讨论

### 2.1 嗜冷酵母菌的菌落形态

培养48 h后,麦芽浸膏培养基上形成4种颜色和形态不同的酵母菌,见图1。

BC-1 菌株:橘黄色、中央隆起、边缘较规则、易于挑起的直径约2~3 mm 的奶油状菌落、表面无光泽、培养时间延长至3~5 d,菌落直径可达4 mm,并由浅橘黄色变为深橘黄色、菌落粘稠性较高。

BC-2 菌株:浅橘黄色、中央隆起、边缘不规则、不易于挑起,菌落较大且菌落间易粘连的奶油状菌落、表面光泽、培养时间延长至3~5 d,菌落大多数粘连在一起、菌落粘稠性较高。

BC-3 菌株:乳白色、中央隆起、边缘较规则、易于挑起的直径约2 mm 左右的奶油状菌落、表面无光泽、培养时间延长至3~5 d,菌落直径可达3 mm。

BC-4 菌株:乳白色、中央隆起、边缘较规则、不易于挑起的直径约1~2 mm 的奶油状菌落、表面光泽发亮、培养时间延长至3~5 d,菌落变大但不是很明显。

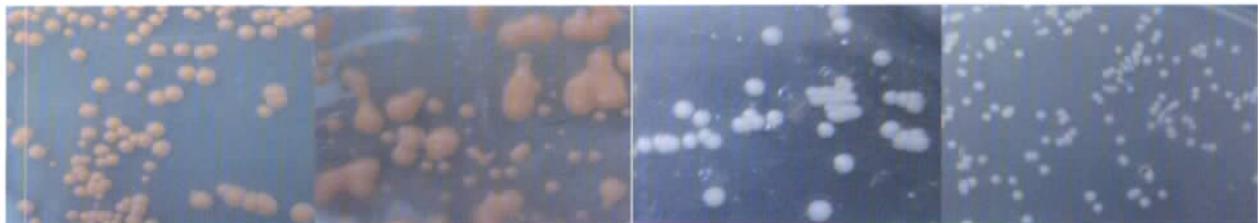


图1 4株低温酵母菌株在 YEPG 培养基上的菌落形态(从左至右为 BC-1;BC-2;BC-3 和 BC-4)

Fig.1 Colonial morphology of 4 yeast strains are growing on YEPG plate (From left to right is BC-1 to BC-4)

## 2.2 嗜冷酵母菌的最适生长温度和 pH 值

**2.2.1 4 株低温酵母菌株最适温度测定** 由表 1 可知,在培养 72 h 后,分别吸取 1 mL 的液体培养基于 420 nm 下测 OD 值。结果显示,4 株酵母菌种均在 15 °C 时 OD 值达到最高,菌悬液浓度即达到最高,为酵母菌最适生长温度。

**2.2.2 4 株低温酵母菌株最适 pH 测定** 由表 2 可知,在培养 72 h 后,分别吸取 1 mL 的液体培养基于 420 nm 下测 OD 值。结果显示,4 株酵母菌种均在 pH 为 6.0 时 OD 值达到最高,菌悬液浓度即达到最高,为酵母菌最适生长 pH。

表 1 不同温度下 4 种嗜冷酵母菌株培养 72 h 后菌悬液的 OD 值

Tab.1 Optimal growth temperature of yeasts isolated from Tianshan mountains permafrost

菌种名称	4 °C	10 °C	15 °C	20 °C	25 °C
BC-1 菌株	0.554 0	0.898 7	1.094 0	0.695 5	0.122 3
BC-2 菌株	0.543 2	0.802 3	1.080 1	0.601 0	0.102 8
BC-3 菌株	0.256 4	0.698 9	1.025 5	0.641 5	0.098 7
BC-4 菌株	0.189 5	0.565 5	1.056 8	0.552 2	0.092 5

表 2 不同 pH 下 4 种嗜冷酵母菌株培养 72 h 后菌悬液的 OD 值

Tab.2 Optimal growth pH of yeasts isolated from Tianshan mountains permafrost

菌种名称	pH						
	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0
BC-1 菌株	0.223 1	0.282 1	0.401 2	0.496 8	0.669 8	0.335 1	0.245 5
BC-2 菌株	0.208 8	0.274 7	0.365 5	0.451 2	0.595 6	0.345 3	0.224 5
BC-3 菌株	0.156 4	0.198 9	0.268 7	0.356 0	0.457 5	0.355 6	0.208 9
BC-4 菌株	0.189 5	0.211 5	0.350 8	0.452 2	0.593 5	0.301 2	0.207 0

## 2.3 26S rRNA 基因扩增和系统发育分析

将提取的基因组 DNA 稀释 100 倍用于 PCR 扩增模板,以 NLI 和 NL4 通用引物特异扩增酵母菌的 26S rDNA 中。电泳结果显示:扩增产物为单一的条带,无非特异扩增现象,见图 2。根据 Marker 相对分子质量大小显示,4 株低温酵母菌的 D1/D2 序列片段大小长度约为 600 bp,与大多数研究报道的酵母菌该基因大小一致。

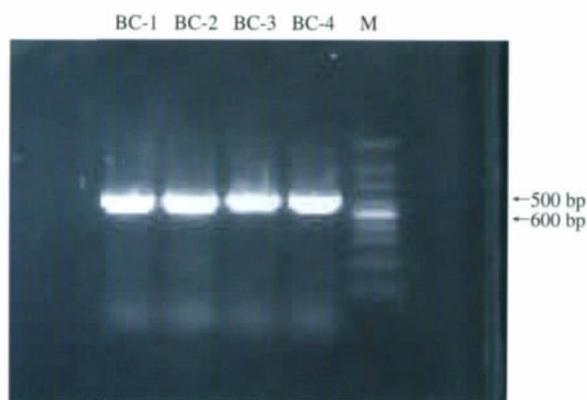


图 2 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测图

Fig.2 PCR amplification result agarose gel electrophoresis

26S rDNA D1/D2 区域序列比较分析构建了酵母菌株 26S rDNA 基因 D1/D2 区的系统发育树,见图 3。由系统发育树可以看出:BC-1 菌株与 *Cystofilobasidium infirmominatum* 亲缘关系最近,序列同源性均在 97% 以上,形成一个簇群,结合 BC-1 菌株的形态学特征、培养特征、生理生化特征、26S rDNA 序列分析,将该菌鉴定为隐球酵母属;BC-2 菌株与 *Sporobolomyces patagonicus* 亲缘关系最近,序列同源性均在 97% 以上,形成一个簇群,结合 BC-2 菌株的形态学特征、培养特征、生理生化特征、26S rDNA 序列分析,将该菌鉴定为掷孢酵母属;BC-3 菌株与 *Clavispora lusitaniae* 亲缘关系最近,序列同源性均在 97% 以上,形成一个簇群,结合 BC-3 菌株的形态学特征、培养特征、生理生化特征、26S rDNA 序列分析,将该菌鉴定为棒孢酵母属;BC-4 菌株与 *Pichia kluyveri* 的亲缘关系达到 99%,结合 BC-4 菌株的形态学特征、培养特征、生理生化特征、26S rDNA 序列分析,说明 BC-4 菌株属于毕赤酵母属。

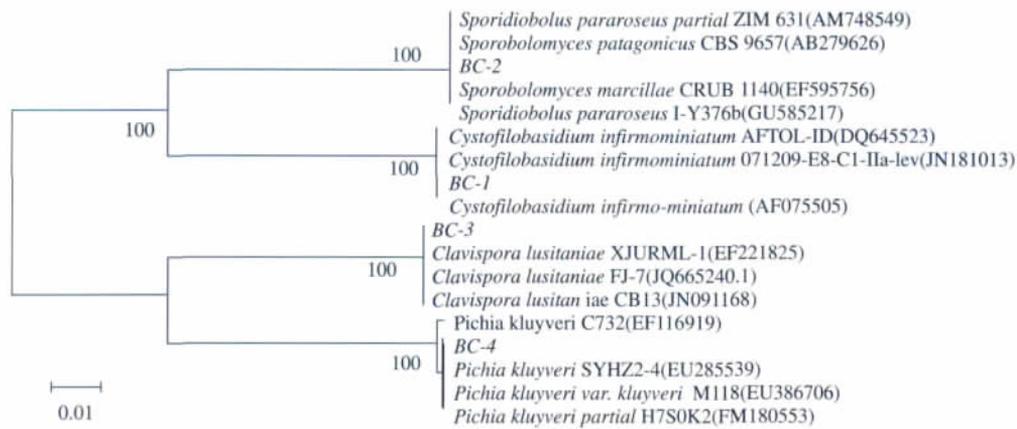


图3 基于26S rDNA序列的4株酵母菌株的系统发育树  
Fig.3 Phylogenetic tree of the 4 yeasts strains based on partial 16S rDNA sequences

### 3 结论

作者依托新疆独特的地理环境,从天山冻土中分离、纯化出嗜冷酵母的菌株,以解决低温酵母菌的来源问题。通过对筛选出的菌株实验室生长条件和确定其与酵母属内其他种之间的系统发育关系进行了同源性的研究,为嗜冷酵母菌的基础研究和工业化应用奠定一定的理论和实践基础。

从天山一号冰川冰层含冰冻土(海拔3833m)中分离出耐冷菌,在有氧和无氧两种条件下,用富集平板初筛培养基和虎红平板初筛培养基分别筛选得到4株嗜冷酵母菌株,其中3株属于好氧菌;其余一株属于厌氧菌,菌株的最适生长温度区间均在15~20℃,属耐冷菌范畴。

对天山冻土进行系列稀释后在麦芽浸膏培养基平板上进行菌种分离,初步分离出菌株4株,菌落颜色大致分为两种,橘黄色和乳白色菌落,镜检为椭圆形初步鉴定为酵母菌,由26S rRNA基因序列同源性分析,结合形态观察和生理生化鉴定,可鉴定4种酵母菌株为:隐球酵母、掷孢酵母、棒孢酵母和毕赤酵母。

毕赤酵母为非致病酵母,在工农业生产中有着很好的潜在应用前景。Droby等<sup>[21]</sup>将毕赤酵母发酵液与CaCl<sub>2</sub>混合后喷洒到成熟的苹果上,可以防止青霉等霉菌的侵染,将苹果发生腐烂的几率降低3%~27%,推测该菌在发酵过程中能产生抗真菌物质,可

抑制有害真菌生长;毕赤酵母具有很强的将木糖转化为木糖醇的能力<sup>[11]</sup>,而木糖醇由于其多功能性而成为近几年研究的热点。

分离出低温酵母菌中有红酵母,后续工作可鉴定此种低温酵母菌是否可产色素。对将来微生物产色素方面的研究具有重要意义。

已发现的嗜冷菌有真细菌、蓝细菌、酵母菌、真菌及嗜冷古生菌。嗜冷菌绝大多数为革兰氏阴性菌,革兰氏阳性嗜冷菌出现的几率较革兰氏阴性嗜冷菌低的多。已鉴定的嗜冷菌属于假单胞菌、弧菌、无色杆菌、黄杆菌、嗜纤维菌和螺菌等。嗜冷菌主要分布于常冷的环境如南北两极地区、高山、冰川、冻土<sup>[4]</sup>、冰窟、冷库、深海和土壤等低温环境中,嗜冷菌的分布受环境温度限制且数量少。嗜冷菌适应低温的机制主要有以下几方面<sup>[15-16]</sup>:1)不饱和脂肪酸含量增加;2)缩短酰基链的长度,增加脂肪酸支链的比例和减少环状脂肪酸的比例等。以上这些为膜的流动性提供了基础,如嗜冷菌能在2℃转运葡萄糖;3)嗜冷菌中的蛋白质在低温下能保持结构上的完整性;4)嗜冷菌中的酶在低温下具有很高的活性,保持了嗜冷菌在低温下生命活动的正常进行;5)嗜冷菌在0℃下具有合成蛋白质的能力,从而保证了低温下蛋白质的正常合成;6)冷休克蛋白的产生使得冷休克基因能正常表达。利用已鉴定出的嗜冷酵母菌对分析和阐明生物多样性形成的机制具有重要的科学研究意义。

## 参考文献:

- [ 1 ] Morita R Y. Psychrophilic bacteria[J]. **Bacterial Rev**, 1975, 39: 144–167.
- [ 2 ] Russell N J. Cold adaptation of microorganisms[J]. **Phil Trans Roy Soc London Serier**, 1990, 329: 279–365.
- [ 3 ] Russell N J. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications[J]. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, 1998, 61: 1–21.
- [ 4 ] Deming J W. Psychrophiles and polar regions[J]. **Curr Opin Microbiol**, 2002, 5: 301–309.
- [ 5 ] Deming J W, Huston A L. An oceanographic perspective on microbial life at low temperature with implications for polar ecology, biotechnology and astrobiology[M]. Dordrecht: Kluwer Publishers, 2000: 149–160.
- [ 6 ] ZENG Yin-xin, CHEN Bo. Isolation and characteristics of one marine psychrotrophic cellulase-generating bacterium from Chuckchi Sea, Arctic[J]. **Chin J Poly Sci**, 2002, 13(2): 157–168.
- [ 7 ] Turchetti B, Buzzini P, Goretti M, et al. Psychrophilic yeasts in glacial environments of Alpine glaciers[J]. **FEMS Microbiol Ecol**, 2008, 63: 73–83.
- [ 8 ] Suel B, Bork P, Huynen M. Genome evolution: gene fusion versus gene fission[J]. **Trends Genet**, 2000, 16(1): 9–11.
- [ 9 ] 程池, 李金霞, 姚粟, 等. Biolog 微生物自动分析系统在酿酒酵母鉴定中的应用[J]. 酿酒科技, 2006, 145(7): 58–64.  
CHENG Chi, LI Jin-xia, YAO Su, et al. Utilization of biolog automated microbes identification system to identify *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Liq-Making Sci & Technol**, 2006, 145(7): 58–64. (in Chinese)
- [10] Droby S, Wisniewski M E, Cohen L, et al. Influence of CaCl<sub>2</sub> on penicillium digitatum, grapefruit peel tissue, and biocontrol activity of HeMa guilliermondii[J]. **Phyt theol**, 1997, 87(3): 310–315.
- [11] Connell L, Redman R, Craig S, et al. Diversity of soil yeasts isolated from south victoria land, antarctica[J]. **Microb Ecol**, 2008, 56: 448–459.
- [12] Pathan A A K, Bhadra B, Begum Z, et al. Diversity of yeasts from puddles in the vicinity of midre lovénbreen glacier, arctic and bioprospecting for enzymes and fatty acids[J]. **Curr Microbiol**, 2010, 60: 307–314.
- [13] 刘光绣, 胡昌勤, 张靖溥, 等. 青藏高原多年冻土微生物的分离分析及其意义[J]. 冰川冻土, 2001, 23(4): 419–422.  
LIU Guang-xiu, HU Chang-qin, ZHANG Jin-bo, et al. Isolation of permafrost microorganisms from Qinghai-Tibetan Plateau and its significance[J]. **J Glaciology and Geocryology**, 2001, 23(4): 419–422. (in Chinese)
- [14] Bowman J P, Mc Cammon S A, Brown M V, et al. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1997, 63(8): 3068–3078.
- [15] 辛明秀, 马延和. 嗜冷菌和耐冷菌[J]. 微生物学通报, 1999, 26(2): 109–155.  
XIN Ming-xiu, MA Yan-he. Psychrophiles and psychrotrophs[J]. **Microbiol**, 1999, 26(2): 109–155. (in Chinese)
- [16] 惠丰立, 柯涛, 褚学英, 等. 大曲中酵母菌种群结构及多样性分析[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(1): 102–106.  
HUI Feng-li, KE Tao, CHU Xue-ying, et al. Analysis on community composition and diversity of yeast isolated from daqu [J]. **J Food Sci Biotechnol**, 2009, 28(1): 102–106. (in Chinese)