

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
53(2):164-172; 4 February 2013  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 天山一号冰川底部沉积层产蛋白酶耐低温菌株的筛选及其系统发育

倪永清<sup>1,2</sup>, 顾燕玲<sup>2</sup>, 史学伟<sup>2</sup>, 郑晓吉<sup>2</sup>, 韩亮<sup>2</sup>, 周红<sup>2</sup>, 程国栋<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院寒区旱区环境与工程研究所, 冻土工程国家重点实验室, 兰州 730000

<sup>2</sup>石河子大学食品学院, 石河子 832000

**摘要:** 【目的】通过对天山一号冰川底部沉积层耐低温菌的分离和其中产蛋白酶菌株的筛选, 了解冰川微生物生理多样性和系统发育多样性, 为高效低温蛋白酶生物技术的研发奠定基础。【方法】采用稀浓度的 R2A、TSB 平板涂布分离可培养细菌, 通过脱脂乳选择性培养基筛选产蛋白酶的耐低温菌株。对分离菌株表型特征、生理生化特性、最适生长温度、耐盐性、产酶性能进行了比较, 结合 16S rRNA 基因序列同源性分析确定产蛋白酶菌株的多样性和系统进化地位, 通过 BOX-PCR 指纹技术分析 16S rRNA 基因序列高相似度的近缘菌株的遗传差异。【结果】从 125 株分离物中筛选到 27 株产蛋白酶的耐低温菌株, 其中 21 株为嗜冷菌, 仅 6 株菌为专性嗜冷菌, 革兰氏阴性菌居多, 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 菌株占 40.7%。产酶菌株隶属于 5 个系统发育类群、9 个属, 其中  $\gamma$ -*Proteobacteria*、*Actinobacteria*、CFB (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*) 为优势类群。【结论】天山 1 号冰川底部沉积层冻土中产蛋白酶的耐低温细菌多样性较丰富, 本研究筛选得到的同属近缘种群较多, 其产酶性状存在差异, 适合开展微生物种群的生物地理学研究。

**关键词:** 天山冰川, 耐低温菌株, 蛋白酶, 系统发育

**中图分类号:** X172    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209(2013)02-0164-09

地球生物圈四分之三属于永久低温环境, 包括南北两极及极地区、深海海水、高原高山地区<sup>[1-2]</sup>。这些生态环境中生存着大量微生物, 根据最适生长温度大体可分两类, 最适生长温度小于等于 15℃、最高生长温度小于 20℃, 能够在 0℃ 甚至更低温度生长的称为嗜冷微生物; 相反能够在 0℃ 生长, 但最适生长温度在 24℃ 左右, 最高生长温度在 30-37℃ 的称为耐冷微生物。来自低温环境的

微生物从大类群上包括细菌、酵母菌、霉菌、微藻等。由于生理上独特的适应性和大分子结构方面特殊性 (包括细胞膜脂质的特殊性、酶分子结构的柔性以及冷激蛋白、低温保护剂分子的快速合成), 这些微生物能够在低温环境中生存、繁衍<sup>[1-2]</sup>。这些微生物分泌的胞外酶在低温下和中度温度下有较高的催化活性, 在温度适当提高后就可以使这些低温酶失活, 因此这些酶不仅在低温环境有机质的循环中发

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (40961002; 41140009); 冻土工程国家重点实验室开放基金项目 (SKLFSE200903); 中国博士后科学基金特别资助 (20100339); 新疆生产建设兵团博士资金专项 (2011BB009)

\* 通信作者。E-mail: gdcheng@lzb.ac.cn

**作者简介:** 倪永清 (1969-), 男, 甘肃武威人, 副教授, 博士后, 主要从事冷环境微生物生态研究。E-mail: niyqlzu@sina.com

**收稿日期:** 2012-08-31; **修回日期:** 2012-11-09

挥着重要的生态学作用,在农业、能源、食品、医药、纺织、环境治理等领域也有广泛的应用价值,目前从低温微生物中筛选新的生物活性物质已成为新的研究热点<sup>[3-4]</sup>。

蛋白酶(Protease)是水解蛋白质的一大类酶的通称,广泛应用于食品、洗涤添加剂、饲料、造纸、制药等行业,占世界用酶市场60%以上的份额。低温蛋白酶是一个相对概念,其最适作用温度通常比同功能的中温(50℃)蛋白酶要低20-30℃左右,且在较低的温度下(0-20℃)拥有较高的酶活性,而在高温条件下(>60℃)的酶活性较差<sup>[5]</sup>。正是由于这些特点使得低温蛋白酶在食品加工、冷水洗涤剂、动植物抗冻、医用疫苗以及生物保鲜方面有着普通中高温蛋白酶无法取代的优越性。例如在肉类工业中,低温蛋白酶可以在低温条件下作用结缔组织胶原和弹性硬蛋白,在50℃左右失活,即使在pH值4-5的条件下也有很好的活性,所以是理想的肉类柔嫩酶制剂<sup>[6]</sup>。

自20世纪70年代以来,相继报道了低温蛋白酶的研究,已从海冰、嗜冷的鱼类和贝类、南北极及环北极的高纬度冻土、高海拔高山冰川、冻土等环境中分离到产低温蛋白酶的菌株<sup>[3]</sup>。国内目前对于产低温蛋白酶菌株的研究大多来自南极及南海深部沉积层,而对分布广泛的高海拔低温蛋白酶菌株的研究报道较少<sup>[7-10]</sup>。天山山脉横亘新疆中部约1700公里,海拔4000多米的山峰终年积雪,形成永久冻土带和冰川,为低温微生物资源的开发提供了丰富的来源。本文对天山一号底部冰、水、岩沉积层永久冷冻环境中产低温蛋白酶的菌株进行了筛选、纯化,并研究了其系统发育多样性,以期为低温蛋白酶生物技术的研发奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:**用于PCR扩增的全套试剂及扩增引物均购自TaKaRa公司。相关生理生化试验所用试剂均购自于天津市巴斯夫化学试剂厂及天津市致远化学试剂厂。高速冷冻离心机为Thermo公司Fresco21型;PCR仪为德国Biometra公司Tprofessional;凝胶成像系统为BioRad公司Gel DOC XR;水平电泳仪为美国BioRad公司PowerPac

Universal、电泳槽SUBCELL GT(20×25 cm)。

**1.1.2 培养基:**耐低温菌株的分离和培养根据Shi等人的方法进行<sup>[11]</sup>,产蛋白酶菌株的筛选采用1/2×TSB+2.5%脱脂乳培养基。

### 1.2 样品采集

样品于2010年7月22日、2011年9月10日采集自天山一号冰川西支尾部的底部沉积层,海拔为3833 m(43°07.125N,86°48.707E)。将冰、水、岩混合沉积层样品迅速装入已灭菌的保鲜盒内,置于车载冰箱中-4℃保存,12小时之内运回实验室,部分样品保存在-70℃超低温冰箱;按样品、蒸馏水1:3的比例在摇床震荡10 min后静置30 min,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。

### 1.3 菌株的分离与纯化

在超净工作台上削去表层可能受到污染的样品,采用梯度稀释液直接平板涂布法对土壤样品进行分离,10℃、18℃分别培养5-10 d。连续转接划线培养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TSB斜面培养基4℃保藏备用。液体纯培养物离心后,加入新鲜培养液重悬,补充15%的灭菌甘油冷冻包藏在-70℃冰箱。

### 1.4 产低温蛋白酶菌株筛选

经液体培养基增菌后,选择适宜的稀释菌液划线于1/4×R<sub>2</sub>A+2.5%脱脂乳培养基平板上,以菌落透明圈作为初筛依据,选择透明圈较大、菌落直径较大的菌株于斜面培养基4℃保存。

### 1.5 产酶菌株生长特性

菌株最适生长温度测定:将产酶菌株的液体培养液按0.5 mL的接入量接入装有5 mL液体富集培养基的试管中,分别置于4℃、10℃、15℃、18℃、24℃、30℃、37℃七个温度梯度下培养,培养24 h后420 nm测OD值。

菌株的耐盐性测定:在液体培养基中分别加入1%、4%、6%、8%、10%、12%、14%、16%浓度的氯化钠溶液,接入产酶菌株,在12℃下培养一周后,420 nm测OD值。

### 1.6 16S rRNA 基因 PCR 扩增和系统进化分析

参照林万明等人的方法<sup>[12]</sup>提取单菌落的DNA,采用细菌16S rRNA基因通用引物27f、1492r进行PCR扩增。PCR产物用AxyPrep™ PCR

Cleanup Kit (AxyGEN) 试剂盒纯化后,由上海美吉生物科技有限公司采用 ABI377DNA 自动测序仪上直接测序。将测序结果提交到 GenBank 数据库中,用 BLAST 进行相关序列的搜索<sup>[13]</sup>,获得相关种、属的 16SrDNA 序列。CLUSTAL X 1.83 软件序列联配<sup>[14]</sup>,进化距离采用邻接法 neighbor-joining 法,依据 p-distances 法和 Kimura-2parameter 双参数法,用 MEGA v. 5.0 软件建立系统发育树<sup>[15]</sup>,进化树分支的置信度采用 bootstrap 法,重复次数为 1000。

### 1.7 产酶菌株 rep-PCR 指纹图谱分析

采用单引物 BOXAIR (5-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3) 进行 PCR 扩增<sup>[16]</sup>,取 10 $\mu$ L 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶、0.5  $\times$  TBE 电泳缓冲液、4V/cm 条件下电泳检测 2 h。根据 PCR 扩增带谱的有无转化为含有 1、0 两值变量的矩阵,采用 Jaccard 相似性系数,使用 NTSYS-pc 2.01 (Applied Biostatistics, Inc) 软件采用非加权算术平均连锁法

(UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic mean) 进行聚类分析。

### 1.8 产酶菌株生理生化特征

参照文献 [17] 进行。

## 2 结果

### 2.1 产酶菌株的筛选

纯化后的菌株依据菌落形态、颜色、细胞形态、革兰氏染色与液体培养特征观察,根据产蛋白酶鉴别培养基上是否出现蛋白水解圈,从冰川底部沉积层样品中分离的 125 个菌株中共筛选得到 58 株疑似产蛋白酶的可培养物,其中 27 株产酶性能良好。革兰氏染色结果表明,27 株产低温蛋白酶菌株中有 17 株为革兰氏阴性菌,占总数的 63%; 10 株为革兰氏阳性菌,占总数的 37%。产酶菌株的产酶情况、菌落颜色、大小、形态、细胞形态见表 1。

表 1 天山 1 号冰川底部沉积层产蛋白酶低温菌株的特征

Table 1 Characteristics of cold-adapted bacterial strains producing protease from permafrost sediments of the bottom layer of the Glacier No. 1 in the Tianshan Mountains

Strains	protease	Growth characteristics		Phylogenetic affiliations		Morphological properties		
		Range temp/°C	Range NaCl/%	Closest relative species	Identity/%	Cell shape	Gram staining	Colony description
A100	++	4-24-37	0-6	<i>Pseudomonas brenneri</i> CFML	98	Rod	G <sup>-</sup>	white, small
A30	+++	4-15-30	0-6	<i>Pseudomonas reactans</i> NO8	99	Rod	G <sup>-</sup>	white, small
A27	++	4-24-37	0-4	<i>Pseudomonas reactans</i> CAI-4	99	Rod	G <sup>-</sup>	Translucency, medium
a13	+	4-24-37	0-6	<i>Pseudomonas reactans</i> CAI-4	99	Rod	G <sup>-</sup>	white, medium
a1	+	4-24-37	0-8	<i>Pseudomonas reactans</i> CAI-4	97	Rod	G <sup>-</sup>	white, small
a4	++	4-24-37	0-6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	Rod	G <sup>-</sup>	White, small
N7	++	4-24-37	0-6	<i>Pseudomonas reactans</i> CAI-4	99	Rod	G <sup>-</sup>	Translucency, big
D9-1	+	4-24-24	0-4	<i>Pseudomonas brenneri</i> F9	99	Rod	G <sup>-</sup>	white, medium
N4	++	4-24-37	0-6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	Rod	G <sup>-</sup>	white, smal
N3	++	4-24-37	0-6	<i>Pseudomonas syringae</i>	97	Rod	G <sup>-</sup>	white, small
m12-2	+++	4-24-37	0-6	<i>Pseudomonas</i> sp. BCw159	98	Rod	G <sup>-</sup>	Translucency, small
Y06	++	4-15-30	0-6	<i>Polaromonas</i> sp. 1024	99	Rod	G <sup>-</sup>	Translucency, medium
N14-2	+	4-24-37	0-6	<i>Polaromonas naphthalenivorans</i>	97	Rod	G <sup>-</sup>	white, big
A07	+++	4-15-24	0-8	<i>Polaromonas</i> sp. 1011	99	Rod	G <sup>-</sup>	white, medium
Y14	+++	4-15-24	0-6	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	97	Rod	G <sup>-</sup>	Translucency, big
W2	++	4-24-30	0-8	<i>Flavobacterium</i> sp. Sr22	97	Rod	G <sup>+</sup>	Yellow, small
D8-1	++	4-24-30	0-6	<i>Chryseobacterium</i> sp. TM3_8	98	Rod	G <sup>+</sup>	Orange, small
R12-2	+++	4-15-24	0-4	<i>Brevundimonas bullata</i>	99	Rod	G <sup>-</sup>	Yellow, big
R12-1	++	4-24-37	0-6	<i>Brevundimonas bullata</i>	99	Rod	G <sup>-</sup>	Yellow, small
A06	+++	4-24-37	0-8	<i>Rhodococcus kroppenstedtii</i>	100	coccoid	G <sup>+</sup>	Yellow, small
Rs-9	+	4-15-24	0-6	<i>Cryobacterium</i> sp. ER1	99	Rod	G <sup>+</sup>	Translucency, medium
T9	++	4-24-37	0-6	<i>Cryobacterium psychrophilum</i>	96	Rod	G <sup>+</sup>	Yellow, small
D5	++	4-24-37	0-6	<i>Arthrobacter psychrophenicus</i>	98	Rod	G <sup>+</sup>	Yellow, small
T16	+	4-24-37	0-6	<i>Kocuria rosea</i> 5-1-2	97	coccoid	G <sup>+</sup>	red, small
Rs-7	++ <sup>a</sup>	4-24 <sup>b</sup> -30	0-6	<i>Kocuria rosea</i> M1S6-6	99	Rod	G <sup>+</sup>	red, small
Rs7	+	4-24-30	0-6	<i>Kocuria rosea</i> M1S6-6	100	Rod	G <sup>+</sup>	Yellow, medium
Y18	+	4-24-37	0-6	<i>Rhodococcus</i> sp. 4115	97	coccoid	G <sup>+</sup>	white, medium

<sup>a</sup> + + +, diameter ratio  $\geq 3$ ; + +, diameter ratio  $\geq 2$ ; + : diameter ratio  $\geq 1$ . <sup>b</sup>The optimal growth temperature.

## 2.2 产酶菌株最适生长温度与耐盐性

实验结果表明(表1), 27株产酶菌株中21株菌最适生长温度为24℃左右, 多数菌株在37℃即停止生长, 属耐冷菌; 只有6株菌最适生长温度为15℃左右, 生长温度范围在0℃-24℃, 属于专性嗜冷菌。在耐盐性研究中, 产酶菌株大多数最大耐盐度为6%,

耐盐性最高的菌株是 m<sub>12-2</sub>, 在8%时仍可以生长, 但生长缓慢, 而其它大多数菌株在此浓度下停止生长。

## 2.3 基于16S rRNA基因序列的产酶菌株系统发育

从天山一号冰川尾部沉积层含冰冻土样品中分离到细菌共125株, 筛选到产低温蛋白酶的菌株27株, 图1为构建的系统发育树。由系统发育树可知

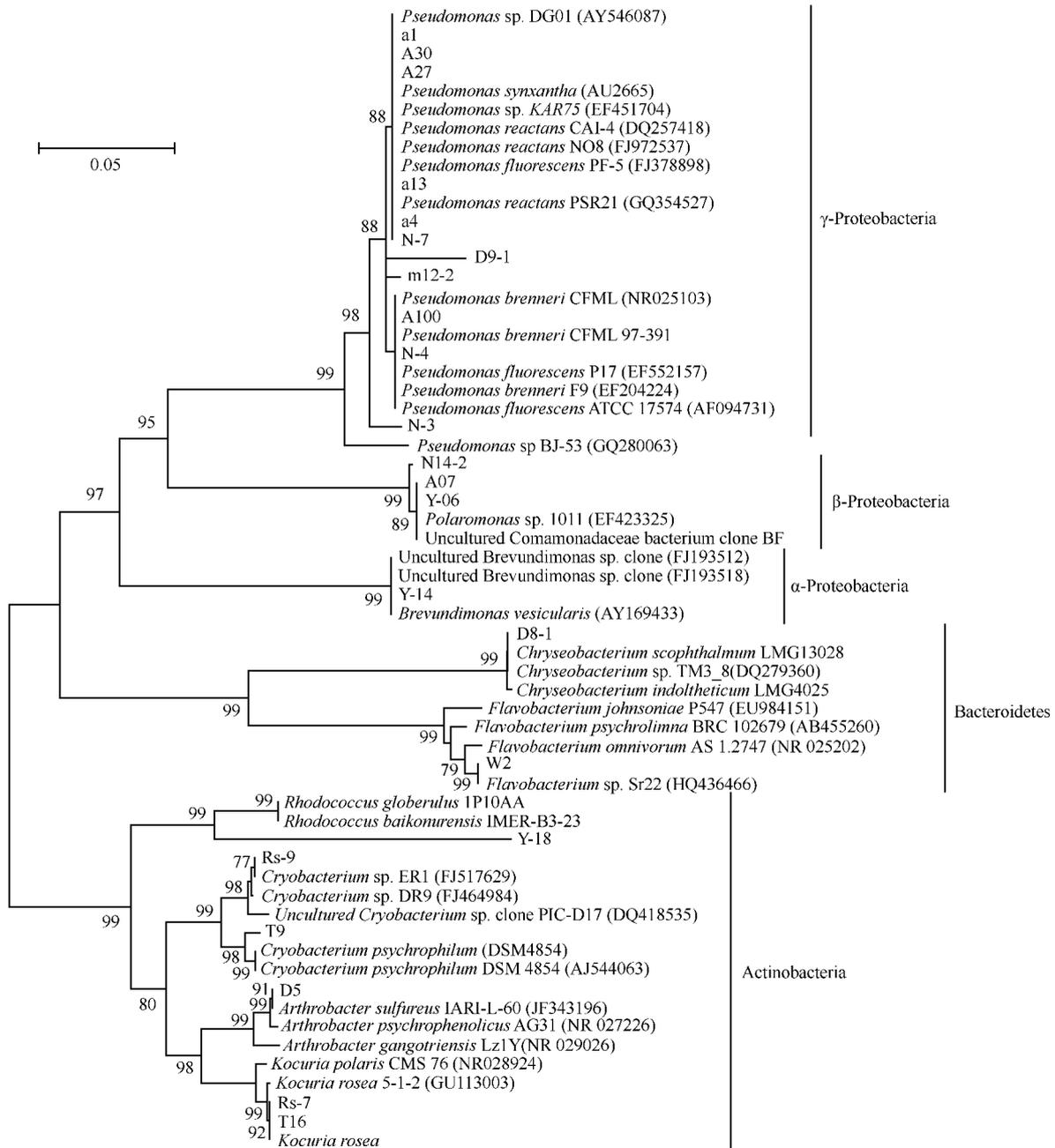


图1 基于部分16S rRNA基因序列的产蛋白酶低温菌株系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among protease-producing strains 16S rRNA gene partial sequences and their closely related sequences downloaded from GenBank. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values (70%) based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled datasets. Bar: 5% sequence divergence.

27 株产蛋白酶菌株分属于  $\alpha$  变形细菌亚纲 ( $\alpha$ -*Proteobacteria*)、 $\beta$  变形细菌亚纲 ( $\beta$ -*Proteobacteria*)、 $\gamma$  变形细菌亚纲 ( $\gamma$ -*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、CFB (Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides) 5 个门(或亚纲)水平的系统发育类群。图 1 和表 1 显示,产低温蛋白酶的菌株隶属于  $\gamma$  变形细菌亚纲的最多,共 11 株,占全部分离菌株总数的 40.7%,根据 16S rRNA 基因序列相似性,全部归属于 *Pseudomonas* 属,其中菌株 A30、A27、a13、a1、N7 与 *Pseudomonas reactan* 亲缘关系较近,菌株 A100、D9-1 与 *Pseudomonas brenneri* 亲缘关系较近,菌株 N3 与 *Pseudomonas syringae* 亲缘关系最近,a4、N4 两株菌与 *Pseudomonas fluorescens* 等多株典型菌株 16S rRNA 基因序列相似性在 99% 以上。此外,菌株 N14-2、A07、Y06 属于  $\beta$  变形细菌亚纲的 *Polaromonas* 属,其中 N14-2 与 *Polaromonas naphthalenivorans* 的相似性达到 97%,而 A07、Y06 与 *Polaromonas hydrogenivorans*、*Polaromonas aquatica* 等多株典型菌株 16S rRNA 基因相似性在 98% 以上。隶属于  $\alpha$  变形细菌亚纲的菌株包括 Y14、R12-2、R12-1,均归属于 *Brevundimonas* 属,菌株 Y14 与 *Brevundimonas vesicularis* 具有 97% 的相似性,后两株菌与 *Brevundimonas bullata* 具有 99% 的序列相似性。在筛选的产蛋白酶菌株中,虽然隶属于放线菌门 (*Actinobacteria*) 的菌株只有 7 株,但依据 16S rRNA 基因序列相似性标准,表现为最高的多样性,分属于 4 个属,其中菌株 Y18、A06 为 *Rhohococcus* 属成员;菌株 Rs-9、T9 隶属于 *Cryobacterium* 属,其中 T9 与 *Cryobacterium psychrophilum* DSM 4854 具有 98% 的序列相似性;菌株 Rs-7、T16 隶属于 *Kocuria* 属,与菌株 *Kocuria rosea* M1S6-6 的序列相似性达 98%;菌株 D5 与节杆菌 *Arthrobacter psychrophenicus* 具有 98% 的序列相似性。隶属于 CFB 门的细菌菌株包括 D8-1 和 W2,分别与可培养菌株 *Chryseobacterium* sp. TM3\_8、*Flavobacterium* sp. Sr22 具有 98%、97% 的 16S rRNA 基因序列同源性。

#### 2.4 产酶菌株 rep-PCR 指纹聚类分析

研究分离到的产低温蛋白酶菌株最多的是隶属于  $\gamma$  变形细菌亚纲的 *Pseudomonas*, 共 11 株,16S rRNA 基因序列分析表明菌株之间的同源性在 97% 以上,这些菌株与多个典型的 *Pseudomonas* 种的同

源性均在 98% 以上,不能准确确定它们的系统发育和遗传差异。采用 BOX-PCR 指纹图谱显示了 *Pseudomonas* 属内菌株以及其它系统发育类群菌株在基因组水平上的差异(图 2A)。可以看出每个菌株产生的条带数在 5-11 之间,图 2B 为指纹图谱聚类分析的树状图,其中 T9、D8-1、W2、Y14 四株菌与 *Pseudomonas* 不同门不同属,表现出最大的遗传差异;11 株 *Pseudomonas* spp. 菌株在 85% 的相似性水平上,可划分为四个群,其中 N3、N4、A100 与 A30 为一群,A27 与 a13、a4 与 N7 各自成一群,具有完全相同的带谱,应该分别对应于三个不同的种;D9-1 与 m12-2 指纹图稍有差别,可能对应于属内另外一个亲缘关系较远的 *Pseudomonas* 种。例外的是菌株 Y06,本属于  $\beta$ -*Proteobacteria* 亚纲细菌,但指纹图谱显示与 *Pseudomonas* 遗传关系较近。

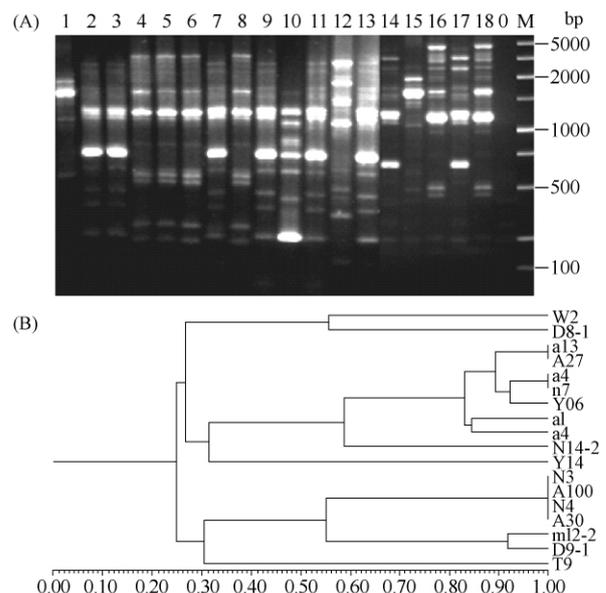


图 2 产蛋白酶菌株的 BOX-PCR 指纹图谱及聚类分析树状图

Fig. 2 BOX-PCR fingerprint patterns of isolates in 1.5% agarose (A). Lanes: 1, W2; 2, a13; 3, A27; 4, N3; 5, A100; 6, N4; 7, a4; 8, A30; 9, N7; 10, Y14; 11, a1; 12, T9; 13, Y06; 14, N14-2; 15, D8-1; 16, m12-2; 17, a4; 18, D9-1; C, blank; M, mark 4000bp ladder. Dendrogram obtained by UPGMA cluster analysis of the BOX-PCR datasets (B).

#### 2.5 产酶菌株典型生理生化特征

表 2 为细菌常规生理生化实验结果,结果表明假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的产酶菌株接触酶阳性,大部分明胶水解呈阴性,多数 V-P 实验阳性,大部分硝酸盐还原实验阴性,菌株之间生理差异与指纹

图谱聚类分群结果基本一致。D9-1、T16、A06 同属于 *Rhodococcus*, 明胶水解阴性, M. R.、V-P、接触酶阳性, 硝酸盐还原阳性; Y6 与 N14-2 生理特性相同, R12-1、R12-2、Rs-9、T9、D5、Rs7、Rs-7 同属 *Actinobacteria*, 但代表不同的种属, 生理生化特征也有差异, 多数明胶水解、硝酸盐还原阴性, M. R.、接触酶实验阳性, V-P 实验阴性。

表 2 产低温蛋白酶菌株的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strains producing cold-active protease

Strains	Gelatin liquefaction	Nitrate reduction	Catalase	M. R.	V-P
Y18	-	+	+	-	-
D8-1	+	+	+	-	-
N7	-	+	+	-	+
A27	-	+	+	-	-
D9-1	-	+	+	+	+
a1	-	-	+	+	+
Y06	-	-	+	+	-
N14-2	-	-	+	+	-
A07	-	-	+	+	-
A100	+	-	-	-	-
Y14	nd	-	-	-	nd
R12-1	-	-	+	+	-
R12-2	-	-	+	+	-
W2	-	-	+	+	-
a13	-	+	+	-	-
Rs-9	-	-	+	+	-
T16	-	-	+	+	+
N3	+	-	-	-	-
A30	+	nd	-	-	nd
m12-2	+	+	+	+	+
T9	-	+	-	+	-
Rs7	-	-	+	+	-
Rs-7	-	-	+	+	-
D5	+	-	+	+	-
N4	+	-	-	-	-
A06	-	-	+	+	+
a4	-	-	+	-	+

-, negative; +, positive; nd, not determined.

### 3 讨论

低温蛋白酶在食品加工、冷水洗涤剂、动植物抗冻、制药、医用疫苗以及生物保鲜方面极具应用潜力和商业价值。虽然地球生物圈 80% 以上为低温环境, 包括两极及近极地区域、深海、海冰、高山冰川冻土, 为产低温酶菌株资源的开发应用提供了极其丰富的源泉<sup>[3]</sup>。但是到目前为止, 低温酶生物技术的应用开发并不成熟, 在资源微生物挖掘的广度和低温酶作用机制、遗传工程改进的深度方面需要

开展更深入的研究<sup>[3,6]</sup>。

根据文献报道, 低温环境中分离的细菌大多数属于耐冷细菌, 最适生长温度在 20 - 25℃, 只有部分菌株为专性嗜冷菌, 最适生长温度在 10 - 15℃。从系统发育来看, 无论海冰、还是冰川冻土等低温环境中, 目前可培养的细菌包括 6 个系统发育类群:  $\alpha$ -*Proteobacteria*、 $\beta$ -*Proteobacteria*、 $\gamma$ -*Proteobacteria*、*Actinobacteria*、CFB (*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*)、*Firmicutes*, 前五个是低温环境中最主要的系统发育类群, 其中至少包括 35 个以上的属<sup>[1,2,18]</sup>。但有证据表明, 不同气候、不同地理基岩环境的冰川、冻土中, 微生物群落落在不同层次分类单元上的组成、丰度明显不同<sup>[19]</sup>。最近针对高山冻土的分子生物学方法研究显示, *Proteobacteria* 丰度占据绝对优势, 其中  $\beta$ -*Proteobacteria* 是最具优势的类群, 但是采用分离培养物的研究方法得到的结果并不一致, 冻土中革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌数量相当, 其中  $\gamma$ -*Proteobacteria* 占据了可培养分离物的优势类群<sup>[20]</sup>。在本研究中, 采用可培养方法结果显示, *Proteobacteria* 和 *Actinobacteria* 门细菌丰度占优势, 其中隶属于  $\gamma$ -*Proteobacteria* 的 *Pseudomonas* 可培养物数量最多, 其次为 *Actinobacteria* 门的 *Arthrobacter*、*Rhodococcus*, 而隶属于 *Firmicutes* 的菌株数量很少, 只分离到一株与 *Paenibacillus polymyxa* 16S 基因序列同源性在 98% 的菌株, 另外一株属于 *Enterococcus durans* (本文中未报道), 但都未显示出具有产蛋白酶的特性。

目前发现, 低温环境中分离的产蛋白酶的菌株, 最常见的是隶属于  $\gamma$ -*Proteobacteria* 亚纲的以下几个细菌属: *Pseudoalteromonas*、*Pseudomonas*、*Psychrobacter*、*Stenotrophomonas*、*Shewanella*、*Colwellia*, 以及隶属于 CFB 的细菌 *Sphingobacterium*、*Flavobacterium*, 而 *Actinobacteria* 中最常见的是 *Arthrobacter*、*Rhodococcus* 属, 相比较而言隶属于 *Firmicutes* 的菌株很少, 其中  $\gamma$ -*Proteobacteria* 亚纲的 *Shewanella*、*Colwellia* 主要发现于深海沉积层<sup>[21]</sup>。本研究结果显示, 天山一号冰川底部沉积层中产蛋白酶的菌株中丰度最高的是 *Pseudomonas* 和 *Arthrobacter*, 系统发育分析显示, *Pseudomonas* 为多样性最高的分类单元 (图 1 和 2)。此外, 从天山一号冰川底部沉积层中分离的产蛋白酶菌株丰富较高的还有  $\beta$ -*Proteobacteria* 亚纲的 *Polaromonas* 属, 而

$\alpha$ -*Proteobacteria* 亚纲的菌株很少。与可培养的  $\gamma$ -*Proteobacteria* 细菌菌株的种数相比,本研究中得到  $\beta$ -*Proteobacteria* 亚纲的可培养物种数比例明显偏低。但是我们开展的高通量测序技术研究显示,丰度和多样性统计均表明一号冰川底部沉积层中  $\beta$ -*Proteobacteria*、CFB 门细菌占绝对优势,分别包括 157、141 个 OTU (97% 的相似性水平统计)、分别占总的测序 reads 数的 52.86%、26% (另撰文报道),而  $\gamma$ -*Proteobacteria* 亚纲的序列只占 3.35%。这可能是由于本研究采用的培养方法和产酶底物脱脂牛奶可能更有利于  $\gamma$ -*Proteobacteria* 的培养和筛选,不利于其它类群的分离<sup>[22]</sup>。尤其在一号冰川底部沉积层中,测序统计的隶属于 *Acidobacteria* 的 reads 占总数的 0.68%。但是到目前为止,所有冷冻低温环境中分离的菌株,隶属于 *Acidobacteria* 门的可培养细菌几乎为零。这其中的原因,一是可能由于到目前为止人们采用的培养基和底物对微生物的选择性培养,另一方面是微生物在营养成分的利用上很可能形成了复杂的代谢网络,其生长条件互为因果<sup>[23]</sup>。尤其是冰川及其底部沉积层,由于表层融水的不断渗透溶解,有机质养分不能得到补充,相比其它冻土环境,这样的极端自然环境有机质营养更加贫瘠,分离的微生物均属于寡营养型,在普通培养基的富营养状态下难以生长。因此,针对这些环境中的微生物资源开发,一方面需要进一步在培养方法和技术上取得突破,另一方面需要开展宏基因组学方法挖掘功能酶及其基因资源。

本研究中冰川沉积层分离得到的耐低温的 *Pseudomonas*、*Arthrobacter*、*Rhodococcus*、*Polaromonas* 菌株,其 16S rRNA 基因序列与分类学地位明确的多个同属细菌典型菌株的相似性在 98% 以上,甚至 99% 以上,因此鉴定最多只能划分在属 (genus) 一级水平<sup>[24]</sup>。此外,虽然本研究分离的同属细菌菌株相互之间的 16S rRNA 基因序列同源性也在 97-98% 以上,但它们的菌落形态、颜色等表型特征以及产酶情况有差异 (包括不产酶、产其它酶性状)<sup>[25-26]</sup>,这说明依据 16S rRNA 基因序列差异标准不能准确反映冰川等冰冻圈环境中的优势种群的系统发育和多样性,需要采用更精确的分子手段确定,这个结果与 Susana 等人从南极分离的产蛋白酶的 *Pseudomonas* 种群相似<sup>[27]</sup>。采用基于全基因组的 rep-PCR 指纹技术和生理学代谢谱可以将 16S rRNA 基因序列同

源性很高的许多 *Pseudomonas* 菌株区分为不同的亚群,可对应于同属不同的种或者种组<sup>[28]</sup>。同理,微生物菌株的产酶性状谱也应该反映种群内的组群特征,显示了微生物种群或者亚种群趋异分化的代谢组学特征,这与目前采用代谢组学技术手段鉴定微生物、揭示微生物种群进化的方法相一致<sup>[29]</sup>。因此,针对特殊的低温和寡营养环境,以不同环境来源的、16S rRNA 基因序列亲缘关系很近的菌株作为研究对象,在种群水平上开展微生物遗传分化、微进化、成种机制以及微生物地理学的研究将极具科学意义和价值。

## 参考文献

- [1] Rodrigues DF, Tiedje JM. Coping with our cold planet. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74 (22) : 1677-1686.
- [2] Margesin R, Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 2011, 162 (3) :346-361.
- [3] Huston AL. Biotechnological Aspects of cold-adapted enzymes // Margesin R, Schinner F, Marx JC, Gerday C. *Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology*. Berlin Heidelberg: Springer, 2008: 347-364.
- [4] Gerday CM, Aittaleb M, Bentahir JP, Chessa P, Claverie T, Collins S, D'Amico. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnology*, 2000, 18 (3) : 103-107.
- [5] Dastager SGA, Dayanand WJ, Li CJ, Kim JC, Lee DJ, Park XP, Tian, Raziuddin QS. Proteolytic activity from an alkali-thermotolerant *Streptomyces gulbargensis* sp. nov. *Current Microbiology*, 2008, 57 (6) :638-642.
- [6] Feller G, Gerday C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Nature Review Microbiology*, 2003, 1 (3) :200-208.
- [7] Zhang R, Zen R. Isolation of deep-sea strain that produce alkaline protease and studies on ITS fermentation condition. *Microbiology China*, 2001, 28 (4) : 5-9. (in Chinese)  
张锐, 曾润颖. 极端微生物产碱性蛋白酶菌株的筛选及发酵条件的研究. *微生物学通报*, 2001, 28 (4) : 5-9.
- [8] Zeng Y, Cai M, Chen B, He J. Characterization of an arctic marine bacterium producing protease. *Chinese Journal of Polar Research*, 2000, 12 (4) : 263-268. (in Chinese)

- 曾胤新, 蔡明红, 陈波, 何剑锋. 一株北极海洋细菌及其蛋白酶的生理生化特征研究. 极地研究, 2000, 12 (4) : 263-268.
- [9] Zeng R, Zhang R, Zhao J, Lin N. Cold-active serine alkaline protease from the psychrophilic bacterium *Pseudomonas* strain DY-A: enzyme purification and characterization. *Extremophiles*, 2003, 7 (4) :335-337.
- [10] Zhou MY, Chen XL, Zhao HL, Dang HY, Luan XW, Zhang XY, He HL, Zhou BC, and Zhang YZ. Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the South China Sea. *Microbial Ecology*, 2005, 58 (3) : 582-590.
- [11] Shi T, Reeves RH, Gilichinsky DA, Friedmann EI. Characterization of viable bacteria from Siberian permafrost by 16S rDNA sequencing. *Microbial Ecology*, 1997, 33 (3) : 169-179.
- [12] 林万明. 《细菌分子遗传学分类鉴定法》. 上海: 上海科学技术出版社, 1990.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution*, 1987, (4) :406-425.
- [14] 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.
- [15] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10) : 2731-2739.
- [16] Versalovic J, Schneider M, deBruijn FJ. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 1994, 5: 25-40.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398.
- [18] Margesin R. Permafrost soils. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.
- [19] Skidmore M, Anderson SP, Sharp M. Comparison of microbial community compositions of two subglacial environments reveals a possible role for microbes in chemical weathering processes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (11) :6986-6997.
- [20] Gangwar P, Alam SI, Bansod S, Singh L. Bacterial diversity of soil samples from the western Himalayas, India. *Can J Microbiology*, 2009, 55 (5) :564-577.
- [21] Olivera NL, Sequeiros C, Nieves ML. Diversity and enzyme properties of protease-producing bacteria isolated from sub-Antarctic sediments of Isla de Los Estados, Argentina. *Extremophiles*, 2007, 11 (3) :517-526.
- [22] Kim EH, Cho KH, Lee YM, Yim JH, Lee HK, Cho JC, Hong SG. Diversity of cold-active protease-producing bacteria from arctic terrestrial and marine environments revealed by enrichment culture. *The Journal of Microbiology*, 2010, 48 (4) :426-432.
- [23] Haruta S, Kato S, Yamamoto K, Igarashi Y. Intertwined interspecies relationships: approaches to untangle the microbial network. *Environmental Microbiology*, 2009, 11 (12) : 2963-2969.
- [24] Rossello-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, 2001, 25 (1) : 39-67.
- [25] Xu Y, Wang D, Shi X, Zheng X, Zhou H, Liu Ya, Ni Y. Selective isolation and diversity of cold-adapted lipase-producing strains from permafrost soil at the terminus of a glacier in the Tianshan Mountains. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 52 (2) :233-240. (in Chinese)  
徐宇丽, 王大伟, 史学伟, 郑晓吉, 周红, 刘娅, 倪永清. 天山冻土产低温脂肪酶菌株的筛选及其多样性分析. 微生物学报, 2011, 51 (2) :233-240.
- [26] Zhang M, Gu Y, Xu Y, Shi X, Zheng X, Zhou H, Ni Y. Phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted bacteria producing  $\beta$ -galactosidase from permafrost sediments of the bottom layer of the Glacier No. 1 in the Tianshan Mountains. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (12) :1605-1615. (in Chinese)  
张明, 顾燕玲, 徐宇丽, 史学伟, 郑晓吉, 周红, 倪永清. 天山1号冰川底部沉积层产 $\beta$ -半乳糖苷酶低温菌株的系统发育分析及生理多样性研究. 微生物学报, 2011, 51 (12) :1605-1615.
- [27] Susana CV, Silvia HC, Walter PMC. Extracellular proteases from eight psychrotolerant Antarctic strains. *Microbiological Research*, 2004, 159 (2) :157-166.
- [28] Cho JC, Tiedje JM. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (12) : 5448-5456.
- [29] Rossello-Mora R, Lucio M, Peña A, Brito-Echeverría J, López-López A, Valens-Vadell M, Frommberger M, Antón J, Schmitt-Kopplin P. Metabolic evidence for biogeographic isolation of the extremophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *ISME Journal*, 2008, 2 (3) : 242-253.

# Phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted bacteria producing protease from sediments of the bottom layer of the Glacier No. 1 in the Tianshan Mountains

Yongqing Ni<sup>1,2</sup>, Yanling Gu<sup>2</sup>, Xuewei Shi<sup>2</sup>, Xiaoji Zheng<sup>2</sup>, Liang Han<sup>2</sup>,  
Hong Zhou<sup>2</sup>, Guodong Cheng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

<sup>2</sup> School of Food Sciences, Shihezi University, Shihezi 832000, China

**Abstract:** [Objective] We characterized proteolytic bacteria isolates from sediments of the bottom layer of the Glacier No. 1 in the Tianshan Mountains, China. Physiological test and phylogenetic analysis were undertaken to expand our knowledge on diversity and ecological distribution of psychrotrophic and psychophilic bacteria populations. [Methods] Using the screening media containing skim milk, we screened cold-adapted strains producing protease. Taxonomic identity and genetic variability of strains isolated was determined by partial 16S rRNA gene sequences and repetitive-element PCR fingerprint. [Results] Of the total 125 cold-adapted bacterial isolates, high levels of protease activity were observed from 27 isolates at optimal growth temperatures ranging from 15 to 24°C in plate assay. Among 27 protease-producing strains, only 6 isolates were psychrophilic. The 16S rRNA gene phylogenetic analysis revealed that protease-producing isolates belonged to 5 phylum, namely  $\alpha$ -,  $\beta$  and  $\gamma$  of *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*. They are affiliated to the genera *Pseudomonas*, *Polaromonas*, *Brevundimonas*, *Rhodococcus*, *Cryobacterium*, *Kocuria*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium* and *Flavobacterium*. The populations of the predominant cultivated protease-producing bacteria are the *Pseudomonas* spp. (40.7%). [Conclusion] The results enriched our knowledge on the phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted strains producing protease in cold environments.

**Keywords:** permafrost, Tianshan Mountains, bacterial phylogeny, cold-adapted protease

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40961002, 41140009), by the General and Special Program of the Postdoctoral Science Foundation of China (201003339) and by the Doctor Special Fund from the Xinjiang Production and Construction Corps (2011BB009)

\* Corresponding author. Tel: +86-931-4967818; E-mail: gdcheng@lzb.ac.cn

Received: 31 August 2012/Revised: 9 November 2012

## 《微生物学报》审稿程序

问:贵刊的审稿程序是怎样的?一般多长时间可以知道稿件是否被录用?

答:本刊严格遵守“三审制”,即:编辑部内审,专家外审,主编总审。从投稿日期开始,争取在2个月之内给出审稿结果,3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后,首先要由编辑初审,通过后再送外审。将请2位专家进行审阅,再送主编进行最后的总审,这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大,编辑部将再请第3位专家进行初审,之后再送主编总审,那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后(即主编给出总审意见),编辑会给作者发出E-mail告知修改意见(包括学术上的和写作格式上的)。作者在返回修改稿后,经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者,在没有完成全部审稿之前,不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。