

## 东南极格罗夫山土壤可培养细菌的分离鉴定及其产胞外酶和抗菌活性

董宁<sup>1,2</sup>, 张迪<sup>2,3</sup>, 俞勇<sup>2</sup>, 苑孟<sup>1,2</sup>, 张晓华<sup>1</sup>, 李会荣<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003

<sup>2</sup> 国家海洋局极地科学重点实验室, 中国极地研究中心, 上海 200136

<sup>3</sup> 山东大学威海分校海洋学院, 威海 264209

**摘要:** 【目的】获得东南极格罗夫山地区土壤中可培养细菌组成信息, 分析菌株胞外水解酶产生及抗菌活性情况。【方法】稀释直接涂布平板法获得可培养细菌菌株并根据其 16S rRNA 基因序列对其进行系统发育分析。平板法初步鉴定菌株的胞外酶产生情况, 琼脂块法分析菌株对 5 种供试菌的抗性。【结果】所有土壤样品共分离出 39 株可培养细菌, 分属于厚壁菌门 (Firmicutes, 19 株, 48.7%)、变形菌门 (Proteobacteria, 分属于  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -变形菌纲, 共计 10 株, 25.6%)、放线菌门 (Actinobacteria, 8 株, 20.5%)、拟杆菌门 (Bacteroidetes, 1 株, 2.6%) 和异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus, 1 株, 2.6%) 等 5 门 20 个菌属, 优势菌属为芽孢杆菌 (*Bacillus*)。不同冻存温度的土壤样品分离菌株有所不同。33 株细菌具有至少一种的胞外酶活力, 其中产淀粉酶的菌株最多 (25 株, 64.1%)。6 株细菌可抑制至少一种供试菌的生长。【结论】格罗夫山土壤可培养细菌组成在大分类上与南极其他地区一致, 但在属的水平上有所不同。分离出的具有胞外酶活性和抗菌活性的适冷菌株为进一步开发利用南极低温酶和抗菌活性物质提供了良好的菌种资源。

**关键词:** 格罗夫山, 可培养细菌, 分离鉴定, 16S rRNA, 胞外酶, 抗菌

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 12-1295-12

南极大陆极端的气候条件使其成为了地球上最严苛的生境之一<sup>[1]</sup>; 它大部分地区常年被冰雪覆盖, 永久无冰区面积仅为其总面积的 0.4% 左右<sup>[2]</sup>。无冰区的风化作用及基于稀少有机物的微生物活动导致了南极大部分土壤的形成<sup>[3]</sup>。南极陆地生境具有比北极更加寒冷 (温度可低至 -60°C)、干燥 (含水量 1% - 10%)、有效养分低的特点, 同时由于极度干旱, 土壤通过沉淀及风化作用积累盐分, 常形成碱性土<sup>[4]</sup>。传统观点认为极端环境一般支撑低

生物量、低多样性的生物群落<sup>[5]</sup>, 而近期的研究表明南极土壤中的微生物多样性水平高于预期<sup>[5-8]</sup>。

微生物在南极生态系统的运转中起着非常重要的作用<sup>[9]</sup>, 其中原核生物 (包括细菌、古菌等) 在许多南极生态系统中占主导地位<sup>[10]</sup>。国内外学者们进行了大量南极土壤细菌系统发育多样性方面的研究<sup>[6, 11-14]</sup>。由于土壤可分离出的微生物种类仅占其微生物总种类数的 0.1% - 1%<sup>[15]</sup>, 为获取较为全面的微生物信息, 近年来对于土壤等环境样品中的

基金项目: 南北极环境综合考察专项 (CHINARE2013-02-01, CHINARE2013-04-01); 国家“863 计划” (2012AA021706)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-21-58717207; E-mail: lihuirong@pric.gov.cn

作者简介: 董宁 (1989 -), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 从事土壤微生物多样性研究。E-mail: dongn.eve@gmail.com

收稿日期: 2013-04-17; 修回日期: 2013-06-19

微生物调查大多采用分子生物学技术<sup>[16]</sup>。但培养方法仍是不可替代的,通过培养获得的微生物往往是环境微生物群落中最能反映生态环境特征的类群<sup>[16-17]</sup>,且通过培养获得的菌株是宝贵的微生物资源,具有潜在的研究和应用价值。

极端环境中孕育着独特的微生物群落<sup>[7]</sup>。栖息于恶劣的南极环境中的细菌,须采取特殊的生存策略以获取竞争优势<sup>[18]</sup>,于是形成了一系列独特的生理特性。这也使得南极成为产新型生物活性物质和先导化合物(酶、抗生素、多糖和脂类等)菌株的潜在种源地<sup>[19]</sup>:Shekh 等从 218 株极地微生物中筛选得到了 7 株对具多重耐药性的真菌 *Candida albicans* NCIM 3471 有明显抗性的菌株<sup>[20]</sup>; Olivera 等从亚南极埃斯塔多斯岛海洋沉积物中分离出了 19 株产蛋白酶的菌株<sup>[21]</sup>。大量的研究工作证明了极地微生物在基础研究和开发应用方面具有广阔的前景<sup>[22]</sup>。

格罗夫山地区(Grove Mountains)(72°20′-73°10′S, 73°50′-75°40′E)地处东南极内陆冰盖伊丽莎白公主腹地,常年被冰雪和冰原岛峰覆盖<sup>[23]</sup>。中国南极第 16 次科学考察队 1999-2000 年间在该地区哈丁山南岭发现的土壤,是人类首次在东南极内陆高原地区发现土壤<sup>[24]</sup>。该地土壤属于南极寒漠土壤(cold desert soil),其主要特征是地表发育漠境砾幕(desert pavement),土壤中含丰富的盐分,呈弱酸性,有机质含量低<sup>[24]</sup>。科学家们对该地区展开了地质<sup>[23-24]</sup>、气象<sup>[25]</sup>等多方面的研究,而对土壤微生物群落方面未有涉及。本文以格罗夫山地区土壤为研究对象,通过对其中分离培养菌株的 16S rRNA 基因序列测定及其系统发育分析,获得该地区可培养细菌组成信息,并对所分离菌株进行胞外酶活性及抗菌活性筛选,以期为格罗夫山土壤微生物资源的开发利用奠定一定的前期基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集及保存

中国第 26 次南极科学考察期间(2009 年 10 月-2010 年 4 月),在格罗夫山哈丁山南岭主峰南坡 3 个相近的土壤位点(72°53′S, 75°1′-75°2′E,海拔 2160 m 左右)分别用无菌小土铲挖去表层约 2 cm 的砂砾、石块,露出土壤后,用新的无菌小土铲挖取约

500 g 土壤,平均分装在 2 个无菌样品袋中,冷冻黑暗运输至国内实验室。3 个位点的土壤样品各命名为 G1 (72°53′01″S, 75°1′48″-75°2′E)、G2 (72°53′02″S, 75°1′30″E)、G3 (72°53′01″S, 75°1′01″E),样品理化性质参见文献[24]。分装好的两份样品分别于-80℃和-20℃保存(保存时间约 1 年)。

### 1.2 菌株分离

参照 Lester 等<sup>[26]</sup>的方法分别收集每份土壤样品中的菌体,经系列稀释后涂布 TSA (Tryptic soy Agar, Difco)、R2A (Difco)、查彼氏培养基(Czapek-Dox Agar, CD, Difco)和 1/100 营养肉汤培养基(Nutrient Brooth, NB, Difco)。分别在 12℃和 28℃条件下培养 30 d 后,根据菌落形态特征差异,挑取单菌落并划线纯化。

### 1.3 16S rRNA 基因序列测定及其分析

**1.3.1 菌落 PCR 模板的制备:**于 0.2 mL 离心管中加入 20 mL 无菌水,用灭菌牙签挑取纯培养单菌落于水中制成菌悬液,煮沸 10 min,混匀后取 2 mL 用作 PCR 模板。

**1.3.2 16S rRNA 基因的扩增:**参照 Bosshard 等<sup>[28]</sup>的方法对分离出的菌株进行 16S rRNA 基因近全长序列的 PCR 扩增。所用引物为 27F (5′-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3′)和 1492R (5′-GGTTACCTG TTACGCTT-3′)。

**1.3.3 PCR 产物的纯化、克隆与测序:**PCR 产物经华舜胶回收试剂盒回收纯化后,连接 pMD 18-T 载体(大连宝生物技术有限公司, TaKaRa)。连接产物转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞(Qigan),经蓝白斑筛选挑取白色单菌落后,用 T 载体通用引物 M13+ (5′-GTAAAACGACGGCCAG-3′)和 M13- (5′-CAGGAAACAGCTATGAC-3′)检测,获得阳性克隆,委托 Intrivogen 生物技术有限公司进行双向测序。将得到的序列登陆 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),获得序列登录号。

**1.3.4 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析:**将所测定的 16S rRNA 基因序列在 EzTaxon (<http://www.eztaxon.org>)中进行有效种的序列相似性搜索,获得相似性较高的相关模式菌株 16S rRNA 基因序列。用 ClustalX 2.0 分别对-20℃和-80℃冻存样品所有分离菌株的 16S rRNA 基因序列及其近似序列进行多序列比对后,用 MEGA 5.05

(Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5.05) 软件进行聚类分析并构建系统发育树。Kimura 双参数模型计算进化距离, 邻接法 (Neighbor-joining) 获得分支系统树, 设定自展值 (Bootstrap value) 1000 以评估系统发育树的拓扑结构稳定性。

#### 1.4 菌株胞外水解酶活性检测

选取 Luria-Bertani (LB) 培养基<sup>[29]</sup> 为基础培养基, 在其中加入特定酶相关底物进行菌株胞外水解酶活力的初步筛选。

**1.4.1 酪蛋白酶 (caseinase) 活性初筛:** 菌株用灭菌牙签点种于含 1% (W/V) 酪蛋白的 LB 固体培养基, 28℃ 培养 1 周。在长出菌落的培养基上覆盖 40% 的三氯乙酸。10 - 15 min 后, 倒去三氯乙酸溶液, 菌落周围出现透明圈者为阳性<sup>[30]</sup>。

**1.4.2 淀粉酶 (amylase) 活性初筛:** 菌株用灭菌牙签点种于添加了 0.2% (W/V) 可溶性淀粉的 LB 固体培养基, 28℃ 培养 4 - 7 d。在菌落周围倾入新鲜配制的 Lugol 氏碘液, 菌落周围出现无色透明圈者为阳性<sup>[31]</sup>。

**1.4.3 纤维素酶 (cellulase) 活性初筛:** 菌株用灭菌牙签点种于添加了 0.5% (W/V) 羧甲基纤维素钠 (carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na) 的 LB 固体培养基, 28℃ 培养 1 周。在长出菌落的培养基上, 倾入 1 mg/mL 的刚果红溶液, 静置 15 min 后倒去刚果红溶液, 加入 1 mol/L 的 NaCl 溶液, 15 min 后倒掉 NaCl 溶液, 菌落周围出现透明圈者为阳性<sup>[32]</sup>。

**1.4.4 木聚糖酶 (xylanase) 活性初筛:** 菌株用灭菌牙签点种于添加了 1% 木聚糖 (W/V) 的 LB 固体培养基, 28℃ 培养 1 周后直接观察。菌落周围出现透明圈者为阳性。

**1.4.5 三丁酸甘油酯酶 (tributyrylase) 活性初筛:** 参照卯敏辰等的方法<sup>[33]</sup>, 配制含 1% (V/V) 三丁酸甘油酯 (tributyryl) 的 LB 培养基。用灭菌牙签将菌株点种于该培养基, 培养 1 周后直接观察。菌落周围出现变色圈者为阳性。

**1.4.6 三辛酸甘油酯酶 (tricaprylinase) 活性初筛:** 菌株用灭菌牙签点种于添加了 1% (V/V) 三辛酸甘油酯 (tricaprylin) 的 LB 培养基, 培养 1 周后直接观察。菌落周围出现模糊的晕圈者为阳性。

**1.4.7 天然甘油三油酸酯酶 (trioleinase) 活性初筛:** 菌株用灭菌牙签点种于添加了 1% (V/V) 甘油三油酸酯 (triolein) 的 LB 培养基, 培养 1 周后直接

观察。菌落周围出现模糊的晕圈者为阳性。

#### 1.5 菌株抗菌活性检测

用于抗菌活性筛选的指示菌 (2 株革兰氏阳性菌、2 株革兰氏阴性菌、1 株真菌) 由中国水产科学研究院东海水产研究所提供, 分别为: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和白假丝酵母菌 (*Candida albicans*)。其中白假丝酵母菌用沙保罗琼脂培养基 (Sabouraud Agar, Difco) 培养, 其余菌株用营养肉汤培养基进行培养。采用琼脂块法<sup>[34]</sup> 对分离到的菌株进行抑菌活性检测, 具体为: 将待测菌株制备成菌悬液, 稀释至适当浓度后涂布 TSA 平板, 28℃ 培养成熟。用打孔器在长出菌落的平板上截取菌落琼脂块, 移至新涂布有指示菌的平板上, 28℃ 培养 2 d, 观察琼脂块周围抑菌圈的产生情况。

## 2 结果

### 2.1 菌株分离纯化及测序

由 -20℃ 和 -80℃ 冻存的土壤样品中分别分离获得 46、30 株细菌, 4 种培养基分离效果依次为 TSA (34 株) > 1/100NB (16 株) > R2A (15 株) > CD (11 株)。28℃ 条件下培养分离得到的菌株 (66 株) 多于 12℃ (10 株)。根据菌落的形态、大小、颜色等特征初步去重复后分别选取 24 (G1、G2、G3 各 10、5、9 株)、15 株 (G1、G2、G3 各 9、1、5 株) 细菌进行后续研究。对以上菌株进行 16S rRNA 基因的扩增及其克隆测序和序列上传, 得到 GenBank 序列号 KC494303-KC494341 (图 1)。

### 2.2 菌株的系统发育分析及初步鉴定

将测序获得的 16S rRNA 基因序列与 EzTaxon 数据库中的参考序列应用 MEGA 5.05 软件绘制系统发育树 (-20℃ 与 -80℃ 冻存样品所得序列的系统发育树分别绘制, 图 1)。

获得的菌种序列在数据库中比对的结果 (表 1) 和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析结果 (图 1) 表明从所有格罗夫山土壤样品中共分离得到 5 门 20 个属的细菌, 主要为厚壁菌门 (Firmicutes, 共 19 株, 占有分离菌株的 48.7%) 的芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)、*Scopulibacillus*、微小杆菌属



表 1. 东南极格罗夫山土壤分离菌株的种系型及产酶情况

Table 1. Phylogenetic relationships and extracellular hydrolytic enzymes production of bacteria isolated from Grove Mountains, East Antarctica

Strains	Soil sample	Storage temperature of soil/°C	Closest match similarity	Identity / %	Extracellular hydrolytic enzymes production					
					Casease	Amylase	Cellulase	Xylanase	Tributyrynase	Tricaprylinase
Firmicutes										
G1-2-20	G1	-20	<i>Bacillus carboniphilus</i> JCM 9731 <sup>T</sup> (AB021182)	97.446	-	-	-	+	-	-
G1-5-20	G1	-20	<i>Bacillus safensis</i> FO-036b <sup>T</sup> (AF234854)	99.930	+	-	+	+	-	-
G1-6-20	G1	-20	<i>Bacillus gibsonii</i> DSM 8722 <sup>T</sup> (X76446)	99.597	+	+	-	-	-	-
G2-1-20	G2	-20	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 <sup>T</sup> (EF114313)	99.801	+	+	-	-	-	-
G2-2-20	G2	-20	<i>Bacillus beringensis</i> BR035 <sup>T</sup> (FJ889576)	99.405	-	+	-	+	-	-
G3-1-20	G3	-20	<i>Bacillus niabensis</i> 4T19 <sup>T</sup> (AY998119)	98.781	+	+	+	+	-	-
G3-2-20	G3	-20	<i>Bacillus methanolicus</i> NCIMB 13113 <sup>T</sup> (AB112727)	96.304	-	-	-	-	-	-
G1-4-80	G1	-80	<i>Bacillus circulans</i> ATCC 4513 <sup>T</sup> (AY724690)	99.327	+	+	-	+	+	-
G3-1-80	G3	-80	<i>Bacillus methanolicus</i> NCIMB 13113 <sup>T</sup> (AB112727)	96.237	-	+	+	-	-	-
G3-4-80	G3	-80	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 <sup>T</sup> (AB190217)	99.693	+	+	-	-	-	-
G3-5-80	G3	-80	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b <sup>T</sup> (NR_042337)	99.730	+	-	+	+	-	-
G1-3-20	G1	-20	<i>Paenibacillus smontaniterrae</i> MXC2-2 <sup>T</sup> (AB295646)	97.671	-	+	+	+	-	-
G2-4-20	G2	-20	<i>Paenibacillus validus</i> JCM 9077 <sup>T</sup> (AB073203)	97.347	-	+	-	-	-	-
G3-5-20	G3	-20	<i>Paenibacillus camelliae</i> blls-2 <sup>T</sup> (EU400621)	98.571	-	+	+	+	-	-
G3-9-20	G3	-20	<i>Paenibacillus camelliae</i> blls-2 <sup>T</sup> (EU400621)	98.027	-	+	+	+	-	-
G3-3-80	G3	-80	<i>Oceanobacillus kimchii</i> X50 <sup>T</sup> (GU784860)	99.866	+	-	-	-	-	-
G1-1-20	G1	-20	<i>Scopulibacillus darangshiensis</i> DLS-06 <sup>T</sup> (AM711118)	94.948	-	-	-	-	-	-
G3-3-20	G3	-20	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 <sup>T</sup> (L37603)	99.796	-	-	-	-	+	+
G1-7-80	G1	-80	<i>Exiguobacterium profundum</i> 10C <sup>T</sup> (AY818050)	99.720	+	+	+	-	-	-
Actinobacteria										
G1-7-20	G1	-20	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 <sup>T</sup> (FJ214355)	99.509	-	+	-	-	-	-
G3-7-20	G3	-20	<i>Micrococcus antarcticus</i> T2 <sup>T</sup> (AJ005932)	99.385	-	+	-	-	-	-
G1-2-80	G1	-80	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM 65004 <sup>T</sup> (FJ214355)	99.509	-	+	-	-	-	-
G1-9-80	G1	-80	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG19861 <sup>T</sup> (AJ415377)	98.353	-	+	-	-	-	-
G1-8-20	G1	-20	<i>Streptomyces somaliensis</i> NBRC 12916 <sup>T</sup> (AB184243)	99.863	+	+	-	-	+	+
G2-5-20	G2	-20	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> LMG 19316 <sup>T</sup> (AJ781321)	99.658	+	+	+	+	+	+
G1-9-20	G1	-20	<i>Mycobacterium moriokaense</i> DSM 44221 <sup>T</sup> (AJ429044)	99.524	-	-	-	-	-	-
G2-3-20	G2	-20	<i>Rhodococcus fascians</i> DSM 20669 <sup>T</sup> (X79186)	99.930	-	+	-	-	+	-
Proteobacteria										
G1-4-20	G1	-20	<i>Kinneretia asaccharophila</i> KIN192 <sup>T</sup> (AY136099)	99.566	-	-	-	-	-	-
G3-8-20	G3	-20	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> LMG 21877 <sup>T</sup> (AJ550856)	99.387	-	-	-	-	-	-
G1-10-20	G1	-20	<i>Phenylobacterium muchangponense</i> A8 <sup>T</sup> (HM047736)	97.559	+	-	-	-	+	-
G3-4-20	G3	-20	<i>Brevundimonas aurantiaca</i> DSM 4731 <sup>T</sup> (AJ227787)	99.929	+	-	-	-	-	+
G1-1-80	G1	-80	<i>Brevundimonas vesicularis</i> LMG 2350 <sup>T</sup> (AJ227780)	99.714	+	+	+	-	+	-
G1-5-80	G1	-80	<i>Brevundimonas nasdae</i> GTC 1043 <sup>T</sup> (AB071954)	99.507	+	+	-	-	+	-
G2-1-80	G2	-80	<i>Brevundimonas vesicularis</i> LMG 2350 <sup>T</sup> (AJ227780)	99.357	-	-	-	-	-	-
G3-2-80	G3	-80	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> GIFU9882 <sup>T</sup> (D84526)	99.509	+	+	-	-	+	-
G1-6-80	G1	-80	<i>Rhizobium pseudoryzae</i> J3-A127 <sup>T</sup> (DQ454123)	96.453	-	+	-	-	-	-
G1-3-80	G1	-80	<i>Acinetobacter pittii</i> LMG 1035 <sup>T</sup> (HQ180184)	99.928	-	-	-	-	+	+
Deinococcus-Thermus										
G3-6-20	G3	-20	<i>Deinococcus ficus</i> CC-FR2-10 <sup>T</sup> (AY941086)	93.499	-	+	-	-	+	-
Bacteroidetes										
G1-8-80	G1	-80	<i>Pedobacter duraquae</i> WB2.1-25 <sup>T</sup> (AM491368)	98.507	-	+	-	-	-	-

+, positive; -, negative.

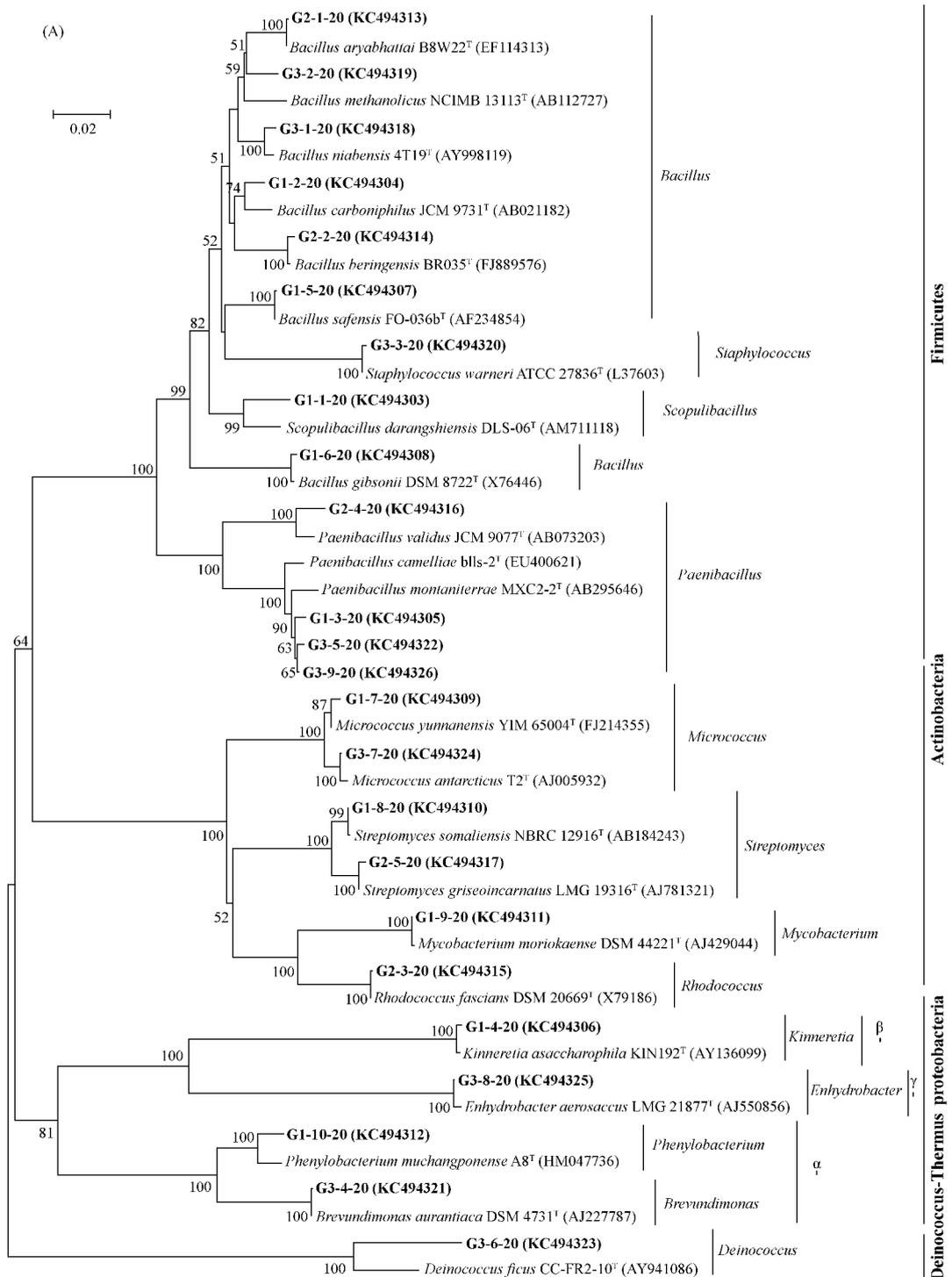
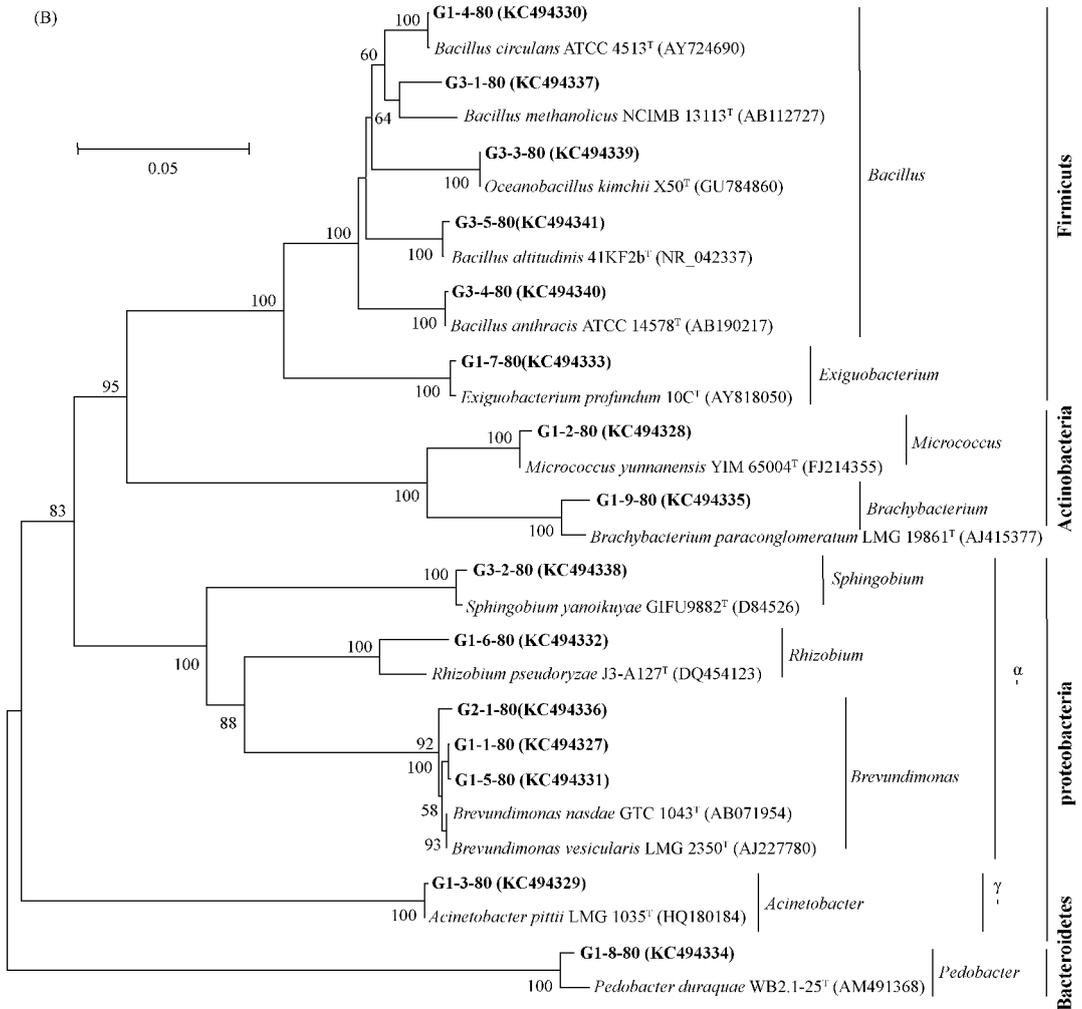


图 1. 格罗夫山土壤分离菌株 16S rRNA 基因序列与数据库中的参比序列构建的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic dendrogram of bacterial 16S rRNA gene sequences from soil samples to closely related sequences from EzTaxon database. A, B relate to the phylogenetic trees of 16S rRNA gene sequences of strains from soil of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$  to their closely related sequences, relatively. Numbers at nodes indicate the bootstrap values over 50% (1000 resamplings). GenBank accession numbers of 16S rRNA gene sequences are given in the parentheses. Sequences from this study are shown in boldtype. Bars in A and B indicate 0.1 nucleotide substitution per sequence position.



续图 1

(*Exiguobacterium*)、*Oceanobacillus*; 变形菌门 (Proteobacteria, 10 株, 占 25.6%) 的 *Kinneretia*、水栖菌属 (*Enhydrobacter*)、苯基杆菌属 (*Phenylobacterium*)、短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、鞘脂菌属 (*Sphingobium*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*); 放线菌门 (Actinobacteria, 共 8 株, 占 20.5%) 的微球菌属 (*Micrococcus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、分支杆菌属 (*Mycobacterium*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、短状杆菌属 (*Brachybacterium*); 异常球菌-栖热菌门 (*Deinococcus-Thermus*, 1 株, 占 2.6%) 的异常球菌属 (*Deinococcus*); 拟杆菌门 (Bacteroidetes, 1 株, 占 2.6%) 的土地杆菌属 (*Pedobacter*) 的细菌。不同冻存温度的土壤分离得到的各菌属菌株数量见图 2。其中, 变形菌门中分离得到的  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -变形菌各 7、1、2 株, 以  $\alpha$ -变形菌为主。芽孢杆菌 (共计 11 株, 占

28.2%) 为格罗夫山土壤可培养菌株中的优势菌属。

不同冻存温度下分离的菌株有所不同。系统发育分析结果显示,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存土壤分离菌株主要聚类于厚壁菌门、放线菌门、变形菌门 ( $\beta$ - $\gamma$ -和  $\alpha$ -变形菌) 和异常球菌-栖热菌门 4 大分支,  $-80^{\circ}\text{C}$  冻存土壤分离菌株主要聚类于厚壁菌门、放线菌门、变形菌门 ( $\alpha$ -和  $\gamma$ -变形菌) 和拟杆菌门 4 大类群, 菌属组成也有所不同 (图 2)。本研究分离的大部分菌株 (34 株) 与其系统发育关系最密切且有效发表的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似度为 97.3% - 99.9%, 而菌株 G1-1-20、G3-2-20、G3-6-20、G1-6-80、G3-1-80 与已明确鉴定的种亲缘关系稍远, 它们与 *Scopulibacillus darangshiensis*、*Bacillus methanolicus*、*Deinococcus ficus*、*Rhizobium pseudoryzae*、*Bacillus methanolicus* 的 16S rRNA 基因序列相似度分别为 94.948%、96.304%、93.499%、96.453%、

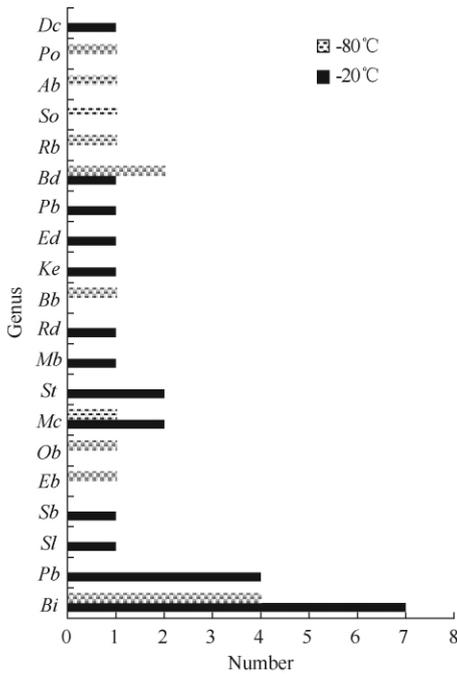


图 2. 不同菌属菌株数量分布图

Figure 2. Distribution of different genera. -20°C and -80°C represent the storage temperature of soil. Dc, *Deinococcus*; Po, *Pedobacter*; Ab, *Acinetobacter*; So, *Sphingobium*; Rb, *Rhizobium*; Bd, *Brevundimonas*; Pb, *Phenylobacterium*; Ed, *Enhydrobacter*; Ke, *Kinneretia*; Bb, *Brachybacterium*; Rd, *Rhodococcus*; Mb, *Mycobacterium*; St, *Streptomyces*; Mc, *Micrococcus*; Ob, *Oceanobacillus*; Eb, *Exiguobacterium*; Sb, *Scopulibacillus*; Sl, *Staphylococcus*; Pb, *Paenibacillus*; Bi, *Bacillus*.

96.237%, 均低于 96.5%。根据 Stackebrandt 等 1994 年的观点, 16S rRNA 基因序列相似度低于 97% 即可认为是新种<sup>[35]</sup>, 因此认为以上 5 株细菌为潜在的新种。

### 2.3 菌株胞外酶活性

格罗夫山土壤样品分离得到的 39 株细菌产各种胞外酶的情况如表 1 所示。33 株细菌(约占总菌株数的 85%)有至少 1 种胞外酶活力。其中菌株 *Streptomyces* sp. G2-5-20 具有除三辛酸甘油酯酶之外的 6 种胞外酶活力, 菌株 *Bacillus* sp. G1-4-80、*Streptomyces* sp. G1-8-20 分别具有 5 种不同的胞外酶活力, 未发现具备全部 7 种胞外酶活力的菌株。

所有产胞外酶的菌株中, 产淀粉酶的菌株最多, 占总菌株数的 64% 左右, 分属于 *Bacillus*、*Paenibacillus*、*Exiguobacillus*、*Streptomyces*、*Micrococcus*、*Brachybacterium*、*Rhodococcus*、*Brevundimonas*、*Sphingobium*、*Rhizobium*、*Deinococcus*、

*Pedobacter* 等 12 属; 产酪蛋白酶的菌株数次之, 约占 41%, 分属于 *Bacillus*、*Oceanobacillus*、*Exiguobacillus*、*Streptomyces*、*Brevundimonas*、*Phenylobacterium* 等菌属。而能产生胞外酶分解脂类 (tributyryl-tricaprylin、triolein)、纤维素和木聚糖的菌株所占比例相对较低, 均不到总菌株数的 30%。具纤维素酶活力的菌株主要分布于 *Bacillus*、*Paenibacillus*、*Exiguobacillus*、*Streptomyces*、*Brevundimonas* 等 5 属, 产木聚糖酶的菌株集中于 *Bacillus*、*Paenibacillus*、*Streptomyces* 等 3 属。所有 39 株细菌中, 12 株具有至少 1 种酯酶活力, 其中菌株 *Staphylococcus* sp. G3-3-20、*Streptomyces* sp. G1-8-20 和 *Acinetobacter* sp. G1-3-80 具备 3 种酯酶活力。

### 2.4 菌株抗菌活性

对 39 株细菌进行致病菌的抗性初步筛选实验, 发现 6 株细菌对至少 1 种供试菌有拮抗作用, 主要为 *Bacillus* 和 *Streptomyces* 等 2 个属的菌株。菌株 *Bacillus* sp. G1-5-20、*Bacillus* sp. G1-4-80、*Bacillus* sp. G3-5-80、*Streptomyces* sp. G2-5-20 能抑制白假丝酵母菌的生长, 菌株 *Bacillus* sp. G1-5-20、*Streptomyces* sp. G1-8-20、*Streptomyces* sp. G2-5-20、*Bacillus* sp. G1-4-80、*Bacillus* sp. G3-4-80、*Bacillus* sp. G3-5-80 可抑制枯草芽孢杆菌的生长, 菌株 *Bacillus* sp. G1-5-20、*Streptomyces* sp. G1-8-20、*Streptomyces* sp. G2-5-20、*Bacillus* sp. G1-4-80、*Bacillus* sp. G3-5-80 抑制金黄色葡萄球菌的生长。未发现对革兰氏阴性菌株大肠杆菌和铜绿假单胞菌有明显抗性的菌株。

## 3 讨论

格罗夫山地区土壤发现至今仅 10 余年, 其中的许多奥秘仍未被揭开。本文对该地区土壤的可培养细菌组成和细菌产生胞外酶的能力及抗菌活性方面的研究, 为格罗夫山土壤揭开神秘的面纱一角。

稀释涂布平板的方法分离微生物的生物量和种类很大程度上取决于选取的培养基组成和温度等培养条件<sup>[36]</sup>, 理论上没有一种培养基可以完全适用于不同微生物, 不同的培养基以及培养温度对菌株的分离培养有一定的筛选性。Sørheim<sup>[37]</sup>、

Tabacchioni<sup>[38]</sup>等的研究也发现用不同的培养基分离得到的菌株之间有较大差异。本研究中,储存在不同温度下的格罗夫山土壤样品,经系列稀释后涂布4种不同的培养基并在2种温度下培养以获取尽可能多的土壤可培养细菌菌株。研究共筛选得到39株细菌,其中TSA培养基、在28℃条件下分离得到最多的菌株,4种培养基均分离到在其他培养基上分离不到的独特类型的细菌。但环境样品中的很多细菌的不易培养是限制以传统培养方法为基础的细菌多样性研究的一个主要因素<sup>[39]</sup>,这种方法获得的细菌组成存在一定的局限性。

南极土壤中的细菌应为世界性分布的,与世界各地土壤中发现的细菌种系型类似<sup>[1,39-40]</sup>。分离自格罗夫山土壤的39株细菌其近缘菌株来源于南极或非南极地区的土壤、空气、水体和生物体等环境。应用分子生物学方法对南极地区土壤的研究表明南极土壤主要细菌种系型为变形菌亚群、CFB群(Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides group, 现更名为拟杆菌门)和革兰氏阳性细菌<sup>[11]</sup>。Aislabie等从南极维多利亚公主地4个位点的土壤样品中分离得到了放线菌门、拟杆菌门、变形菌门和厚壁菌门4大类的菌株,由于受培养方法限制,未分离得到蓝细菌(cyanobacteria)和酸杆菌(*Acidobacterium*)<sup>[39]</sup>。本研究从东南极格罗夫山土壤分离得到变形菌门( $\alpha$ - $\beta$ -和 $\gamma$ -变形菌)、拟杆菌门、和革兰氏阳性的厚壁菌门、放线菌门和异常球菌-栖热菌门5大类群,大水平上符合前人的研究,但在属水平上与前人的研究有一定不同。南极麦克默多干谷(McMurdo Dry Valley)土壤中分离的菌株多为棒状杆菌(*Corynebacterium*)、无色杆菌(*Achromobacter*)、芽孢杆菌、节杆菌(*Arthrobacter*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)、微球菌、动球菌(*Planococcus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、链霉菌、诺卡氏菌(*Nocardia*)等<sup>[1]</sup>。肖昌松等对南极菲尔德斯半岛土壤细菌的分离研究发现假单胞菌属和芽孢杆菌属为该地区主要优势菌群,另外在该地区还分离出了微球菌属、葡萄球菌属、产碱菌属(*Alcaligenes*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和节细菌属<sup>[41]</sup>。表明芽孢杆菌是南极土壤中可培养细菌的一大类群。本研究分离得到的芽孢杆菌(11株,28.2%)为绝对优势菌属,

基本符合上述观点。此外,我们在格罗夫山土壤中还分离得到了类芽孢杆菌(4株,10.3%)、微球菌(3株,7.7%)、短波单胞菌(3株,7.7%)等优势菌属和链霉菌属、葡萄球菌属、红球菌属、土地杆菌属等共计20属。各地区分离菌株的差异与细菌群落组成和分离方法等因素相关。温度可调节生物的生长速率和活性<sup>[42]</sup>,采集的土壤样品在不同的冻存温度(-20℃和-80℃)下分离得到菌株种类和数量有所不同,推测这可能与不同温度下土壤中有活力的菌株类型不同有关。

采用培养方法获得土壤样品中的细菌揭示了土壤中有活力有机体成员,并为微生物对寒冷干燥环境适应的研究提供了合适的研究对象<sup>[39]</sup>。由格罗夫山土壤样品中分离得到的菌株G3-6-20其近缘菌株奇异菩提球菌(*Deinococcus ficus*)属于异常球菌属,该属最显著的特征为对紫外线、 $\gamma$ -辐射和干燥等极端环境的耐受能力<sup>[43]</sup>。同时菌株G3-6-20与现有的菌株相似度低于94%(为93.499%),为潜在的新种(属),有进一步的研究价值。南极是微生物新种属的生存繁衍地<sup>[19,44-45]</sup>,从格罗夫山土壤中分离出5株与已有的物种相似度低于96.5%的菌株,为潜在的新种(属)。同时南极又是产新型生物活性物质和先导化合物(酶、抗生素等)菌株的潜在种源地<sup>[19]</sup>。微生物胞外酶在南极环境中非常重要,通常南极环境中易代谢的小分子物质浓度较低,而高分子化合物不能被微生物摄取。利用胞外酶降解大分子聚合物常被认为是微生物代谢有机物颗粒中的限速步骤<sup>[46]</sup>。由东南极格罗夫山土壤中分离出的39株细菌中33株具备至少一种的胞外水解酶活力,大部分菌株产生的酶种类有限,其生态营养多功能性较低,但也有些菌株可产生多种胞外酶(如菌株*Streptomyces* sp. G2-5-20、*Bacillus* sp. G1-4-80、*Streptomyces* sp. G1-8-20等)。这是细菌对南极常年冷冻环境适应性的一种表现。另一方面,细菌的拮抗活性有助于其通过减少竞争者的存在而在长期低温的南极环境中得到适应<sup>[18]</sup>。研究发现格罗夫山土壤中分离的菌株有6株(15.4%)对至少一种供试菌有拮抗活性,其拮抗作用主要针对革兰氏阳性细菌(金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌)和真菌(白假丝酵母菌),而未发现对革兰氏阴性细菌(大肠杆

菌和铜绿假单胞菌) 有明显抑制作用的菌株。Giudice 等对分离自南极海洋地区的 580 株细菌的抗菌活性筛选得到 22 株 (3.8%) 对 1-3 种指示菌有抗菌活性的菌株。与本文研究结果不同, 22 株海洋细菌对革兰氏阴性细菌的抑制作用更为明显<sup>[18]</sup>。这一点可以通过南极土壤中革兰氏阳性菌株为优势类群<sup>[11]</sup> 而南极海洋环境的优势类群为革兰氏阴性菌株<sup>[18, 47]</sup> 来解释。

南极地区独特的地理、气候特征, 造就了该地区微生物特殊的生理特征和适应机制<sup>[48]</sup>。微生物资源的开发利用是南极地区的研究热点之一。本研究对东南极格罗夫山地区土壤中可培养细菌组成进行了报道, 获得了该地区有活力的细菌信息及其系统发育关系, 进而对这些细菌的胞外酶活性和抗菌活性进行初步研究, 为进一步开发利用南极低温酶和抗菌活性物质资源打下前期基础。

**致谢** 感谢中国极地研究中心的魏福海, 帮忙采集获得土壤样品。

## 参考文献

- [1] Cowan DA, Tow LA. Endangered Antarctic environments. *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58: 649-90.
- [2] Cary SC, McDonald IR, Barrett JE, Cowan DA. On the rocks: The microbiology of Antarctic dry valley soils. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8 (2): 129-138.
- [3] Negoita TG, Stefanic G, Irimescu-Orzan ME, Palanciuc OV. Chemical and biological characterization of soils from the Antarctic east coast. *Polar Biology*, 2001, 24 (8): 565-571.
- [4] Margesin R, Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research in Microbiology*, 2011, 162: 346-361.
- [5] Niederberger TD, McDonald IR, Hacker AL, Soo RM, Barrett JE, Wall DH, Cary SC. Microbial community composition in soils of Northern Victoria Land, Antarctica. *Environmental Microbiology*, 2008, 10 (7): 1713-1724.
- [6] Roesch LFW, Fulthorpe RR, Pereira AB, Pereira CK, Lemos LN, Barbosa AD, Suleiman AKA, Gerber AL, Pereira MG, Loss A, Costa EM. Soil bacterial community

abundance and diversity in ice-free areas of Keller Peninsula, Antarctica. *Applied Soil Ecology*, 2012, 61: 7-15.

- [7] Ganzert L, Lipski A, Hubberten H, Wagner D. The impact of different soil parameters on the community structure of dominant bacteria from nine different soils located on Livingston Island, South Shetland Archipelago, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 76: 476-491.
- [8] De la Torre JR, Goebel BM, Friedmann EI, Pace NR. Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (7): 3858-3867.
- [9] Wynn-Williams DD. Antarctic microbial diversity: the basis of polar ecosystem processes. *Biodiversity and Conservation*, 1996, 5: 1271-1293.
- [10] Nichols D, Bowman J, Sanderson K, Nichols CM, Lewis T, McMeekin T, Nichols PD. Developments with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, 10 (3): 240-246.
- [11] Li HR, Sun JK, Chen LS, Yu Y, Chen B, Ren DM. Phylogenetic analysis of bacterial diversity in topsoil samples from Fildes Peninsula, Antarctic. *Chinese Journal of Polar Research*, 2005, 17 (4): 245-254. (in Chinese)  
李会荣, 孙嘉康, 陈丽珊, 俞勇, 陈波, 任大明. 南极菲尔德斯半岛表层土壤样品中细菌多样性的系统发育分析. *极地研究*, 2005, 17 (4): 245-254.
- [12] Connon SA, Lester ED, Shafaat HS, Obenhuber DC, Ponce A. Bacterial diversity in hyperarid Atacama Desert soils. *Journal of Geophysical Research*, 2007, 112, G04S17: 1-9.
- [13] Pointing SB, Chan Y, Lacap DC, Lau MCY, Jurgens JA, Farrell RL. Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106 (47): 19964-19969.
- [14] Lee CK, Barbier BA, Bottos EM, McDonald IR, Cary SC. The inter-valley soil comparative survey: the ecology of dry valley edaphic microbial communities. *The ISME Journal*, 2012, 6: 1046-1057.
- [15] Broke TD. The study of microorganisms in situ: progress and problems. Symposium of the Society for General

Microbiology, 1987, 41: 1-17.

- [16] Wang P, Wang FP. Phylogenetic diversity of culturable bacteria in lake sediment of Aridley Island, Antarctic. *Chinese Journal of Polar Research*, 2009, 21 (2): 100-108. (in Chinese)  
王鹏, 王风平. 南极阿德雷岛淡水湖沉积物细菌群落研究. 极地研究, 2009, 21 (2): 100-108.
- [17] Sait M, Hugenholtz P, Janssen PH. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology*, 2002, 4 (11): 654-666.
- [18] Giudice AL, Bruni V, Michaud L. Characterization of Antarctic psychrotrophic bacteria with antibacterial activities against terrestrial microorganisms. *Journal of Basic Microbiology*, 2007, 47: 496-505.
- [19] Zeng YX, Chen B. Progress and application prospects in the study on Antarctic cold-adapted microorganisms. *Chinese Journal of Polar Research*, 1999, 11 (2): 341-251. (in Chinese)  
曾胤新, 陈波. 南极低温微生物研究及其应用前景. 极地研究, 1999, 11 (2): 341-251.
- [20] Shekh RM, Singh P, Singh SM, Roy U. Antifungal activity of Arctic and Antarctic bacteria isolates. *Polar Biology*, 2011, 34: 139-143.
- [21] Olivera NL, Sequeiros C, Nievas ML. Diversity and enzyme properties of protease-producing bacteria isolated from sub-Antarctic sediments of Isla de Los Estados, Argentina. *Extremophiles*, 2007, 11: 517-526.
- [22] Zhu TJ, Gu QQ, Zhu WM, Fang YC, Liu PP. Isolation of Antarctic microorganisms and screening of antitumor activity. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2006, 25 (1): 25-27. (in Chinese)  
朱天骄, 顾谦群, 朱伟明, 方玉春, 刘培培. 南极微生物的分离及抗肿瘤活性筛选. 中国海洋药物杂志, 2006, 25 (1): 25-27.
- [23] Zhou C, Ai S, Chen N. Grove Mountains meteorite recovery and relevant data distribution service. *Computers & Geosciences*, 2011, 37: 1727-1734.
- [24] Li XL, Liu XH, Ju YT, Huang FX. Properties of soils in Grove Mountains, East Antarctica. *Science in China (D series)*, 2002, 32 (9): 767-775. (in Chinese)  
李潇丽, 刘小汉, 琚宜太, 黄费新. 东南极格罗夫山地区的土壤特征. 中国科学 (D 辑), 2002, 32 (9): 767-775.
- [25] Cheng YJ, Lu LH, Bian LG. Summer weather characteristics of Grove mountain area in east Antarctic. *Chinese Journal of Polar Research*, 1999, 11 (4): 291-300. (in Chinese)  
程彦杰, 陆龙骅, 卞林根. 东南极格罗夫山地区夏季的天气特征. 极地研究, 1999, 11 (4): 291-300.
- [26] Lester ED, Satomi M, Ponce A. Microflora of extreme arid Atacama Desert soils. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 39: 704-708.
- [27] Jackson CR, Roden EE, Churchill PF. Changes in bacterial species composition in enrichment cultures with various dilutions of inoculum as monitored by denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (12): 5046-5047.
- [28] Bosshard PP, Santini Y, Grüter D, Stettler R, Bachofen R. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Ecology*, 2000, 31 (2): 173-182.
- [29] Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning, A Laboratory manual. First edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987.
- [30] 常显波. 不同环境海洋放线菌多样性研究及 2 株放线菌新菌的分类鉴定. 中国海洋大学博士学位论文. 2011.
- [31] 张晓华. 海洋微生物学. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2007.
- [32] Teather RM, Wood PJ. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43 (4): 777-780.
- [33] Wu MC, Sun CR, Wu XZ. Diffusion plate assay for quick and rough estimation of alkaline lipase activity. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2000, 19 (2): 168-172. (in Chinese)  
邬敏辰, 孙崇荣, 邬显章. 平板扩散法粗略确定碱性脂肪酶的活性. 无锡轻工业学报, 2000, 19 (2): 168-172.
- [34] 祖若夫, 胡宝龙, 周德庆. 微生物学实验教程. 上海: 复旦大学出版社, 1993.
- [35] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.

- International Journal of Systematic Bacteriology*, 1994, 44 (4): 846-849.
- [36] Li ZK, Yao Q, Chen MB, Zhu HH. Isolating tomato rhizobacteria using root exuding pectin. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2012, 18 (1): 147-152. (in Chinese)  
黎志坤, 姚青, 陈美标, 朱红惠. 利用果胶培养基分离番茄根际细菌. 应用与环境生物学报, 2012, 18 (1): 147-152.
- [37] Sørheim R, Torsvik VL, Goksøyr J. Phenotypical divergences between populations of soil bacteria isolated on different media. *Microbiol Ecology*, 1989, 17: 181-192.
- [38] Tabacchioni S, Chiarini L, Bevivino A, Cantale C, Dalmastri C. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microbiol Ecology*, 2000, 40: 169-176.
- [39] Aislabie JM, Chhour K, Saul DJ, Miyauchi S, Ayton J, Paetzold RF, Balks MR. Dominant bacteria in soils of Marble Point and Wright Valley, Victoria Land, Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry*, 2006, 38: 3041-3056.
- [40] Aislabie JM, Broady PA, Saul DJ. Culturable aerobic heterotrophic bacteria from high altitude, high latitude soil of La Gorce Mountains (86°30'S, 147°W), Antarctica. *Antarctic Science*, 2006, 18 (3): 313-321.
- [41] Xiao CS, Liu DL, Zhou PJ. The survey of total number of bacteria and fungi isolated from the Fildes Peninsula in Antarctic. *Antarctic Research*, 1994, 6 (4): 67-72. (in Chinese)  
肖昌松, 刘大力, 周培瑾. 南极菲尔德斯半岛微生物总量的调查. 南极研究, 1994, 6 (4): 67-72.
- [42] Lin W, Wang Y, Pan Y. Short-term effects of temperature on the abundance and diversity of magnetotactic cocci. *Microbiology Open*, 2012, 1 (1): 53-63.
- [43] Peng F, Zhang L, Luo X, Dai J, An H, Tang Y, Fang C. *Deinococcus xinjiangensis* sp. nov., isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 709-713.
- [44] Yong Y, Li H, Zeng Y, Sun K, Chen B. *Pricia antarctica* gen. nov., sp. nov., a member of the family Flavobacteriaceae, isolated from Antarctic intertidal sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62: 2218-2223.
- [45] Hirsch P, Gallikowski CA, Siebert J, Peissl K, Kroppenstedt R, Schumann P, Stackebrandt E, Anderson R. *Deinococcus frigens* sp. nov., *Deinococcus saxicola* sp. nov., and *Deinococcus marmoris* sp. nov., low temperature and draught-tolerating, UV-resistant bacteria from continental Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27: 636-645.
- [46] Vazquez SC, Coria SH, Cormack WPM. Extracellular proteases from eight psychrotolerant Antarctic strains. *Microbiological Research*, 2004, 159: 157-166.
- [47] Bruni V, Gugliandolo C, Maugeri T, Allegra A. Psychrotrophic bacteria from a coastal station in the Ross Sea (Terra Nova Bay, Antarctica). *Microbiologica*, 1999, 22: 357-363.
- [48] Chu HY. Microbial communities in high latitudes and high altitudes ecosystems. *Microbiology China*, 2013, 40 (1): 123-136. (in Chinese)  
褚海燕. 高寒生态系统微生物群落研究进展. 微生物学通报, 2013, 40 (1): 123-136.

# Extracellular enzyme activity and antimicrobial activity of culturable bacteria isolated from soil of Grove Mountains, East Antarctica

Ning Dong<sup>1,2</sup>, Di Zhang<sup>2,3</sup>, Yong Yu<sup>2</sup>, Meng Yuan<sup>1,2</sup>, Xiaohua Zhang<sup>1</sup>,  
Huirong Li<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

<sup>2</sup> Key Laboratory for Polar Science of State Oceanic Administration, Polar Research Institute of China, Shanghai 200136, China

<sup>3</sup> Marine College, Shandong University at Weihai, Weihai 264209, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the composition of culturable bacteria from soil of Grove Mountains, East Antarctica and analyze the production of extracellular hydrolytic enzymes and antibacterial and antifungal activities of these culturable bacteria. [Methods] We used spread plate method to obtain culturable bacteria. Phylogenetic relationship was analysed based on their 16S rRNA gene sequences. We used plate method and agar block method to detect the production of extracellular enzymes and antibacterial and antifungal activities of these bacteria, separately. [Results] We obtained a total of 39 isolates from all the soil samples. They belonged to 20 genera and grouped into Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Deinococcus-Thermus lineages, of which each group occupied 48.7%, 25.6%, 20.5%, 2.6%, 2.6% of the total, respectively. *Bacillus* was dominant. We isolated different strains from soil stored at different temperatures, and this may be explained as viable bacteria were different at diverse temperatures. Of the 39 isolates 33 showed the activity of producing at least one extracellular enzyme. Amylase-producing strains were the most (64.1%), 6 strains were able to inhibit the growth of at least one tested bacterium or fungus. [Conclusion] Strains with extracellular enzyme activity and antibacterial and antifungal activity would contribute to the exploration of cold-active enzymes and antibacterial (antifungal) material in Antarctica.

**Keywords:** Grove Mountains, culturable bacteria, isolation and identification, 16S rRNA, extracellular enzyme, antibacterial and antifungal activity

(本文责编:张晓丽)