

北极高维度海域海冰嗜冷菌系统发育多样性及其低温水解酶分析

俞 勇 李会荣 陈 波 曾胤新 何剑锋

(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)

摘 要 :应用样品直接稀释涂布平板、 -1°C 富集培养和 -20°C 冷冻 24h 后富集培养等 3 种方法,从北极加拿大海盆和格陵兰海的高纬度海域($77^{\circ}30'\text{N} \sim 81^{\circ}12'\text{N}$)海冰中分离到 37 株嗜冷菌。根据其 16S rDNA 全长序列所进行的系统发育分析表明,分离菌株分属于 γ -变形细菌群(γ -Proteobacteria)的 *Colwellia*、*Marinobacter*、*Shewanella*、*Thalassomonas*、*Glaciecola*、*Marinomonas*、*Pseudoalteromonas* 和嗜纤维菌-曲挠杆菌-拟杆菌群(*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, CFB)的 *Flavobacterium*、*Psychroflexus* 等 9 个属。其中有 9 株菌的 16S rDNA 序列与已明确鉴定种的相似性在 93.4%~96.9%,为潜在的新种。北极加拿大海盆海冰细菌 BSi20002 与南极威德尔海海冰细菌 *Marinobacter* sp. ANT8277 的 16S rDNA 序列相似性为 100% 表明在种水平上南、北两极也存在相同的细菌。分离的嗜冷菌在 4°C 条件下能产生多种大分子物质水解酶类,其中 62.6%、51.4% 和 40.5% 的菌株分别能水解 Tween-80、明胶和淀粉。

关键词 北极 海冰 嗜冷菌 系统发育多样性 低温水解酶

中图分类号 :Q939 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2006)02-0184-07

海冰是地球上最寒冷的环境之一,其环境温度在 0°C 到 -35°C 变动。与淡水冰不同,海冰是个半固体矩阵,冰晶间弥漫着大小不等、充满卤水的孔、道网络,在海冰内部形成了温度、盐度和营养盐浓度急剧变化地封闭或半封闭的微生物境^[1]。在这极端环境中存在一个复杂的充满活力的海冰微生物群落,包括游离病毒、细菌、自养藻、原生动物和后生动物。海冰细菌是海冰微生物群落的重要成员,不仅作为初级生产者群落中的原生动物、后生动物提供食物,更重要的是作为分解者在海冰有机物矿化中起主导作用,据估算海冰初级生产量的 20%~30% 通过细菌进行物质循环^[2]。海冰细菌系统发育多样性研究始于 1997 年 Bowman 等对南极普利兹湾海冰的研究^[3],随后人们利用传统培养技术和“非可培养”的分子生物学技术开展了南极威德尔海、Lazarev 海^[4]和北极楚科奇海^[5]、Fram 海峡^[4]、Spitzbergen 岛屿附近峡湾^[6]海冰样品的细菌系统发育多样性分析。南、北两极海冰细菌的种系型具有很高的相似性,分属于 α 、 γ -变形细菌群(α 、 γ -Proteobacteria)嗜纤维菌-曲挠杆菌-拟杆菌群(*Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, CFB)、低 G+C 含量革兰氏阳性菌群(Low mole percent G+C gram-positive bacteria)和高 G+C 含

量革兰氏阳性菌群(High mole percent G+C gram-positive bacteria)等。

现在通用的嗜冷菌(Psychrophiles)概念由 Morita 于 1975 年给出,是指最高生长温度 $\leq 20^{\circ}\text{C}$,最适生长温度 $\leq 15^{\circ}\text{C}$,最低生长温度 $\leq 0^{\circ}\text{C}$ 的一类细菌,而那些最低生长温度 $\leq 0^{\circ}\text{C}$,最适生长温度 $> 15^{\circ}\text{C}$,最高生长温度 $> 20^{\circ}\text{C}$ 的细菌称为耐冷菌(Psychrotolerants)^[7]。虽然 Morita 的定义原则上证明是有用的,但随着不同环境分离的低温细菌数量和生态学数据不断增加,发现一些细菌并不能严格符合 Morita 的定义,促使人们重新考虑定义中的限制温度。Helmke 和 Weyland(2004 年)综合研究南、北两极和温带海洋不同环境低温细菌的温度特性之后,提出在 Morita 定义的基础上增加“中度嗜冷菌(Moderate psychrophiles)”的概念来定义低温环境中普遍存在、数量可观的一类细菌,其最低生长温度 $\leq 0^{\circ}\text{C}$,最高生长温度在 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ ^[8]。

本文报道从北极加拿大海盆和格陵兰海的高纬度海域海冰样品中分离纯化的 37 株嗜冷菌(包括 Psychrophiles 和 Moderate psychrophiles),通过其 16S rDNA 序列测定、系统发育分析以及产低温水解酶情况研究,揭示海冰中嗜冷菌的多样性,丰富嗜冷

基金项目:国家 973 项目(2004CB719601);国家自然科学基金项目(30500001,40376001);国家海洋局青年海洋科学基金项目(2005112);科技部基础研究专项基金项目(2003DEB5J057)

作者简介:俞勇(1977-),男,浙江宁海人,助理研究员,硕士,研究方向为海洋与极地微生物学。Tel:86-21-58711026;Fax:86-21-58711663;E-mail:yurenny77@vip.sina.com

其他作者:蔡明红

收稿日期:2005-08-22;接受日期:2005-10-12;修回日期:2005-12-22

菌多样性的种类,为今后嗜冷菌的利用打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集和处理 海冰样品分别于2002年德国 Polarstar 航次格陵兰海考察(8~10月) 2002年美-加 Louis St. Laurent 航次加拿大海盆考察(8~9月) 2003年中国第二次北极科学考察(7~9月)期间采集自北极加拿大海盆和格陵兰海的高纬度海域(77°30'N~81°12'N)。每个站位用9"MARK II 冰芯钻钻取1支冰芯。冰芯从冰底开始切成10cm~20cm段,用0.22 μ m膜过滤的无菌海水在低温黑暗条件下等渗融化。

1.1.2 培养基:①菌株分离培养基为海洋2216培养基:bacto-蛋白胨5g,bacto-酵母粉2g,磷酸铁10mg,琼脂粉16g,天然海水1000mL;②盐度耐受试验培养基:由不同浓度的NaCl溶液替代海洋2216培养基中的天然海水配置;③产酶培养基^[6]。

1.1.3 主要试剂和仪器:0.22 μ m核孔滤膜(Whatman,英国);bacto-蛋白胨(DIFCO laboratories, Detroit, MI);bacto-酵母粉(DIFCO laboratories, Detroit, MI);华舜小量细菌基因组DNA快速抽提纯化试剂盒(上海华舜生物工程有限公司,上海);博光胶回收试剂盒(上海博光生物科技有限公司,上海);pMD 18-T载体(TaKaRa公司,日本);Taq DNA聚合酶(Sigam,美国);正向引物8f:5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3'(8~27, *Escherichia coli* 相应序列的位置)和反向引物1492r:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'(1492~1510, *E. coli* 相应序列的位置);Mastercycler Gradient 梯度PCR仪(Eppendor 公司,德国);ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer 自动测序仪(Perkin Elmer 公司,美国)

1.2 菌株分离

使用3种方法从海冰样品中分离细菌(1)等渗融化样品10倍系列稀释后,直接涂布平板,4 $^{\circ}$ C培养30~60d;(2)取1mL等渗融化样品接种于9mL 0.22 μ m膜过滤的无菌海水中,-1 $^{\circ}$ C培养30d后,稀释涂布平板,4 $^{\circ}$ C培养30~60d;(3)10mL等渗融化样品-20 $^{\circ}$ C冷冻24h,取1mL接种于9mL 0.22 μ m膜过滤的无菌海水中,-1 $^{\circ}$ C培养30d后,稀释涂布平板,4 $^{\circ}$ C培养30~60d。从上述平板中根据菌落大小、形态、颜色等挑取单菌落并划线纯化。

1.3 海冰细菌的温度、盐度耐受性

参照文献[9]进行。

1.4 菌株产酶情况

菌株在4 $^{\circ}$ C条件下的产酶情况分析参照文献[6]进行。

1.5 16S rDNA 序列测定和分析

1.5.1 菌体总DNA的提取:应用华舜小量细菌基因组DNA快速抽提纯化试剂盒抽提菌体总DNA,作为PCR模板DNA。

1.5.2 16S rDNA序列的PCR扩增与测序:16S rDNA序列PCR扩增参照Bosshard等^[10]方法进行,引物为8f和1492r。PCR产物经博光胶回收试剂盒纯化后,pMD 18-T载体连接,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10感受态细胞,经蓝白斑筛选,获得阳性克隆,交由上海晶泰生物技术有限公司测序。

1.6 序列分析及数据处理

将获得的序列登录GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),应用BLASTN程序与数据库中的已有细菌16S rDNA序列进行比较分析。这些新分离细菌的序列与从数据库(GenBank + EMBL + DDBJ + PDB)中获得的相近序列,应用CLUSTALX1.81进行多序列匹配比对,用系统发生推断软件包PHYLP3.62^[11]进行统计和聚类分析。用Kimura双参数模型计算各序列分化距离,缺少和不确定的位点在计算中被省略。采用邻接法(neighbor-joining method)获得分支系统树,并通过自举分析(bootstrap)进行置信度检测,自举数据集为1000次。

1.7 数据库存取号(Accession number)

海冰嗜冷菌的16S rRNA基因序列在GenBank数据库中的存取号为:DQ000316, DQ007429 ~ DQ007436, DQ007438 ~ DQ007444, DQ060391, DQ060402。

2 结果

2.1 嗜冷菌的分离及其产酶情况

从北冰洋加拿大海盆和格陵兰海高纬度海域的18个海冰站位采集了55个海冰样品,应用3种不同方法分离出细菌356株,经温度试验共获得嗜冷菌37株(见后面的表1)。其中样品直接稀释涂布平板分离到嗜冷菌9株,分属于柯尔韦氏菌(*Colwellia*)、海杆菌(*Marinobacter*)、假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas*)、希瓦氏菌(*Shewanella*)等4个属;-1 $^{\circ}$ C富集培养分离得到11株,分属于*Colwellia*、*Thalassomonas*、*Marinobacter*、*Shewanella*、黄杆菌(*Flavobacterium*)等5个属,经-20 $^{\circ}$ C冷冻24h后



JOURNALS.IM.AC.CN

富集培养分离到 17 株, 分属于 *Colwellia*、*Glaciecola*、*Marinobacter*、海单胞菌 (*Marinomonas*)、*Shewanella*、*Flavobacterium*、*Psychroflexus* 等 7 个属, 该方法更适合于从环境中分离嗜冷菌。这些菌株的共同特点是最适生长温度不超过 15°C, 需要一定的 Na⁺ 才能生长, 多数菌株的盐度耐受范围在 5‰ ~ 60‰ NaCl 之间, 且在天然海水培养基中的生长情况优于同等盐浓度的 NaCl 培养基。

分离的嗜冷菌在 4°C 条件下能产生多种大分子物质水解酶类, 其中 62.6%、51.4% 和 40.5% 的菌株分别能水解 Tween-80、明胶和淀粉, 超过 27% 的菌株可以利用酪蛋白, 少量菌株具有产生卵磷脂酶或 β -半乳糖苷酶的能力, 但所有的菌株都不能分解几丁质和琼胶 (表 1)。分离菌株的产酶能力存在类群的差异, *Colwellia*、*Thalassomonas*、*Pseudoalteromonas* 和 *Glaciecola* 等属的嗜冷菌产酶能力较强, 多数菌株能同时产生 3 ~ 4 种酶类; 而 *Marinobacter*、*Marinomonas*、*Shewanella*、*Flavobacterium* 和 *Psychroflexus* 等属的嗜冷菌产酶能力较弱, 除 *Shewanella* 属的少数菌株能产 2 种酶外, 其余菌株只能产 1 种酶或不产酶。产生大分子物质水解酶的菌也具有类群的差别, 产酯酶 (Tween-80) 的菌最多, 属于 *Colwellia*、*Thalassomonas*、*Glaciecola*、*Pseudoalteromonas*、*Shewanella*、*Psychroflexus* 等 6 个属; 明胶酶产生菌分布于 *Colwellia*、*Thalassomonas*、*Pseudoalteromonas*、*Shewanella* 等 4 个属; 淀粉酶产生菌属于 *Colwellia*、*Thalassomonas*、*Glaciecola* 等 3 个属; 酪蛋白酶由 *Colwellia*、*Thalassomonas*、*Pseudoalteromonas* 等 3 个属的菌株分泌; β -半乳糖苷酶仅局限于 *Glaciecola* 和 *Flavobacterium* 属的菌株; 只有 *Marinobacter* 属的菌株才产卵磷脂酶。

2.2 系统发育分析

分离的嗜冷菌测定其 16S rRNA 基因序列 (28 ~ 1491 bp, *E. coli*) 并进行了系统发育分析。这 37 株细菌分别归属于 γ -变形细菌群的 *Colwellia* (15 株)、*Marinobacter* (10 株)、*Shewanella* (5 株)、*Thalassomonas* (1 株)、*Glaciecola* (1 株)、*Marinomonas* (1 株)、*Pseudoalteromonas* (1 株) 和嗜纤维菌-曲挠杆菌-拟杆菌群的 *Flavobacterium* (2 株)、*Psychroflexus* (1 株) 等 9 个属 (表 1)。通过 16S rRNA 基因序列相似性分析, 共选出 18 株菌与从数据库中获得的相近序列构建系统发育树 (见后面的图 1)。在 γ -变形细菌群中共发现 5 个新的亲缘类群分支。第 I 个分支位于 *Colwellia* 属, 菌株 BSi20007、BSi20045、BSi20095、

BSi20497、BSi20517 和 BSi20520 单独聚为一支, 与嗜压科尔韦氏菌 (*Colwellia pizophile*) 最为接近, 16S rDNA 序列相似性为 93.4% ~ 98.2%; 第 II 个分支由 BSi20537 和分离自美国波士顿海港的菌株 UMB8H 构成, 两者的相似性为 99.8%, 与它们亲缘关系较近的菌是 *Thalassomonas viridans* (95.2%) 和 *Colwellia pizophile* (95.8%); 第 III 个分支位于 *Glaciecola* 属, 包含一个菌株 BSi20170, 与 *Glaciecola punicea* 亲缘关系最近, 相似性为 96.9%; 第 IV 个分支由 6 株亲缘关系非常接近 (99.7% ~ 100%) 的南、北极海冰细菌组成 (BSi20002、BSi20041、BSi20675、*Marinobacter* sp. ARK10244、*Marinobacter* sp. 1-Ba、*Marinobacter* sp. ANT8277), 与其最接近的菌是 *Marinobacter lipolyticus* 相似性为 96.0% ~ 96.3%; 第 V 个分支为菌株 BSi20101, 与 *Marinomonas* 属的 *Marinomonas primoryensis* 相似性最高 (93.9%)。 γ -变形细菌亚纲中的其它菌株与已明确鉴定的种有很近的亲缘关系, BSi20169、BSi20586、BSi20593 和 BSi20062 与 *Colwellia rossensis*、*Shewanella livingstonensis*、*Shewanella frigidimarina* 和 *Pseudoalteromonas elyakovii* 的相似性分别为 99.0%、99.3%、99.0% 和 99.3%。嗜纤维菌-曲挠杆菌-拟杆菌群的 BSi20510 与 *Flavobacterium degerlachei* 最为接近 (98.9%), BSi20642 与 *Psychroflexus torques* 的 16S rRNA 同源性最高 (99.4%)。

3 讨论

海冰中的细菌最初来源于海水浮游细菌、藻类、原生动物和小型后生动物等生物体表附着细菌以及海底沉积细菌, 随着温度的降低、海冰的生长, 这些细菌被逐步选择, 最终形成了海冰细菌群落^[1]。各类细菌在海冰中的分布与冰藻 (Ice algae) 集聚密切相关。从冰藻集聚冰层中分离的嗜冷菌约是无冰藻集聚冰层的 10 倍^[12], 占分离菌株的 39% ~ 90%^[13]。本研究中, 所采集的冰芯都没有冰藻集聚现象, 嗜冷菌所占的比例也较低, 只有 10.3%。其中有 13 株菌的最高生长温度达到 25°C, 超出了 Morita 嗜冷菌定义的最高生长温度 (20°C), 符合 Helmke 和 Weyland 提出的“中度嗜冷菌 (Moderate psychophiles)”概念。Groudieva 等^[6]、Helmke 和 Weyland^[8]的结果也表明超过一半以上的北极海冰嗜冷菌的最高温度在 20°C ~ 25°C, 与绝大部分南极海冰嗜冷菌的最高温度在 20°C 以下^[14]相比, 北极海冰嗜冷菌的温度适应范围显得较宽。这些差别可能是由南、北两极海洋不同

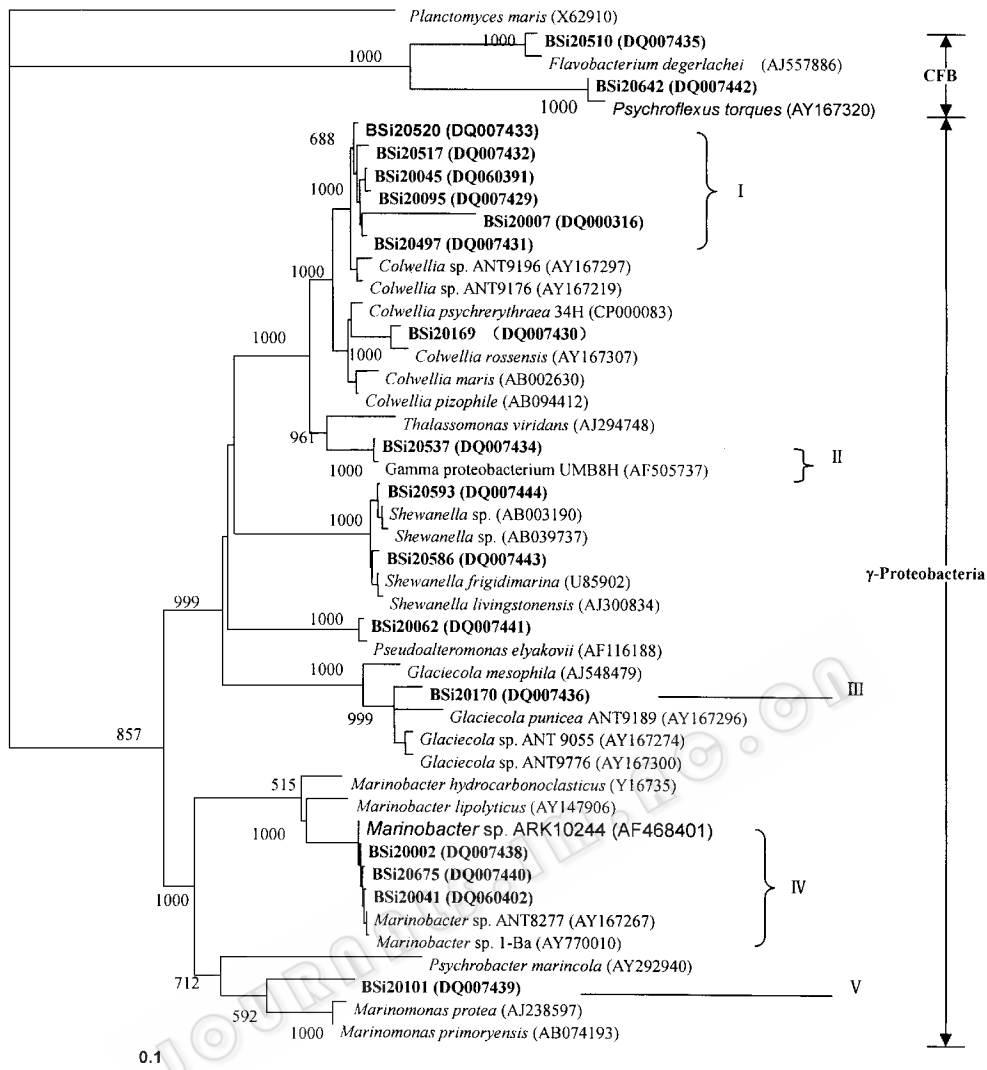


图 1 以 16S rDNA 序列为基础的海冰嗜冷菌系统发育树

Fig.1 Phylogenetic relationships among 16S rDNA sequences for psychrophilic bacteria isolated from Arctic sea-ice and other cultured organism. Evolutionary distances were calculated by the method with Kimura two-parameter calculation model. The 50% majority-rule trees were constructed by the neighbor-joining method. *Planctomyces maris* (X62910) was used as outgroup organism. Value of 1000 bootstrap resamplings that supported the branching orders in each analysis is shown above or near the relevant nodes. Scale bars correspond to a 10% difference in nucleotide sequence. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences.

的地理环境特征造成的。一方面, 南极海洋包围着具有窄而深大陆架的南极大陆, 鲜有淡水、陆源有机物和陆源营养物的输入, 而北冰洋被大陆包围, 接收的淡水量大约是全球大洋淡水输入总量的 10%, 为北冰洋带来了丰富的陆源有机物和陆源营养物; 另一方面, 南极海洋由于南极绕极流的存在相对孤立, 北极海洋与大西洋和北太平洋之间却有着频繁的水体交换, 为北极海洋带来了大量的暖水。陆地径流、大西洋和北太平洋暖水携带着大量细菌到达海冰形成区域的水体, 最终影响了北极海冰细菌的群落结构。

作为海冰生态系统的重要组成部分, 海冰细菌

的系统发育多样性只是从 1997 年开始才得到较为系统的研究^[3]。其中海冰嗜冷菌多样性研究较为深入的是南极普利兹湾^[12]和北极楚柯奇海海域^[5]。海冰嗜冷菌主要归属于 α -变形细菌亚纲 (α -Proteobacteria), γ -变形细菌亚纲 (γ -Proteobacteria) 和嗜纤维菌-曲挠杆菌-拟杆菌群 (Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides, CFB)。本文从北极加拿大海盆和格陵兰海的高纬度海域海冰样品中分离到 37 株嗜冷菌, 通过 16S rDNA 序列测定和系统发育分析表明, 这些菌株归属于 γ -变形细菌亚纲的 *Colwellia*、*Marinobacter*、*Shewanella*、*Thalassomonas*、*Glaciecola*、*Marinomonas*、*Pseudoalteromonas*、和嗜纤维菌-曲挠杆

菌-拟杆菌群的 *Flavobacterium*、*Psychroflexus* 等 9 个属(表 1)。其中有 10 株菌的 16S rDNA 序列与已明确鉴定种的相似性为 93.4% ~ 96.9%，根据 Stackebrandt 和 Goebel 的观点^[15]，16S rDNA 序列相似性在 97% 以下就可认为是新种。在大的分类范围上，本研究的结果与以往的研究基本相同。但在属或种的水平上，与已经报道的有一定的差别。这些结果可以共同说明海冰嗜冷菌具有较为丰富的系统发育多样性。

现在一般认为嗜冷菌很难在地球的两极扩散，原因主要是由于嗜冷菌只有通过深海环流才有可能通过炎热的赤道从地球的一极扩散到另一极，但深海环流在两极的交换需要上百年的时间，在这么长的时间内很难保证细菌不发生变异；另外也没有直接的证据证明嗜冷菌能通过高空大气环流在两极扩散^[2]。因此，海冰嗜冷菌被认为是研究细菌地理学的理想对象。本文和以往报道的结果都表明，一些细菌的属在南、北两极同时存在。2002 年 Junge 等在应用 16S rDNA 序列(357 ~ 907, *E. coli* 相应序列的位置)分析北极海冰细菌遗传多样性时发现，菌株 aws-11B5 (AF283859) 与南极海冰嗜冷菌 *Shewanella frigidimara* ACAM 600 的相似性达到 100%，认为在南、北极同样也分布着相同的种^[5]。以该序列应用 BLASTN 程序与数据库中的已有细菌 16S rDNA 序列进行比较发现，与 *Shewanella frigidimara* ACAM 600 的相似性为 100% 的序列共有 20 条，其中 11 条来自南极普利兹湾海水细菌(本研究室提供)，3 条来自南极海冰、1 条来自北极 Spitzbergen 附近峡湾海冰、2 条来自北极楚柯奇海海冰、2 条来自加拿大海盆海冰(BSi20593、BSi20607，本研究)，1 条来自澳大利亚大宝礁珊瑚虫细菌克隆文库，说明 *Shewanella frigidimara* 在南、北极海水海冰广泛存在。本研究中位于 *Marinobacter* 属的第 IV 个新分支的 6 株菌的 16S rDNA 全长序列相似性非常接近(99.7% ~ 100%)，其中北极加拿大海盆海冰细菌 BSi20002 与南极威德尔海海冰细菌 *Marinobacter* sp. ANT8277 的遗传距离为 0，进一步支持了 Junge 等的观点。更为有意思的是，加拿大海盆海冰细菌 BSi20537 与分离自美国波士顿海港生物膜形成菌株 UMB8H 的遗传距离小于 0.0002，加拿大海盆海冰嗜冷菌 BSi20593 与澳大利亚大宝礁珊瑚虫细菌克隆文库中的一条 16S rDNA 全长序列的遗传距离小于 0.0003，16S rDNA V3-V5 区序列相似性为 100%，是否意味着限制物种分布的生理学和地理学屏障容易被突

破^[21]，一些细菌的种能在条件迥异的环境下生存。

致谢 此项工作是由国家财政部资助，国家海洋局极地考察办公室组织实施的“中国第二次北极考察项目(简称 CHINARE-2003)”的一部分，参加此项工作的单位是中国极地研究中心、国家海洋局第一研究所、国家海洋局第二研究所、中国海洋大学等，在此一并表示感谢。同时感谢 2002 年德国 Polarstar 航次格陵兰海考察和美-加 Louis St. Laurent 航次加拿大海盆考察为本研究提供部分样品。

参 考 文 献

- [1] Thomas DN, Dieckmann GS. Antarctic Sea ice - a habitat for extremophiles. *Science*, 2002, **295**(25): 641 - 644.
- [2] Staley JT, Gosink JJ. Poles apart: Biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 1999, **53**: 189 - 215.
- [3] Mock T, Thomas DN. Recent advances in sea-ice microbiology. *Environ Microbiol*, 2005, **7**(5): 605 - 619.
- [4] Brinkmeyer R, Knittel K, Jürgens J, et al. Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic Pack Ice. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(11): 6610 - 6619.
- [5] Junge K, Imhoff F, Staley T, et al. Phylogenetic diversity of numerically important Arctic Sea-Ice bacteria cultured at Subzero temperature. *Microb Ecol*, 2002, **43**(3): 315 - 328.
- [6] Groudieva T, Kambourova M, Yusef H, et al. Diversity and cold-active hydrolytic enzymes of culturable bacteria associated with Arctic sea ice, Spitzbergen. *Extremophiles*, 2004, **8**(6): 475 - 488.
- [7] Morita RV. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev*, 1975, **39**: 146 - 167.
- [8] Helmke E, Weyland H. Psychrophilic versus psychrotolerant bacteria-occurrence and significance in polar and temperate marine habitats. *Cell Mol Bio*, 2004, **50**(5): 553 - 561.
- [9] Borriss M, Helmke E, Hanschke R, et al. Isolation and characterization of marine psychrophilic phage-host systems from Arctic sea ice. *Extremophiles*, 2003, **7**: 377 - 384.
- [10] Bosshard PP, Santini Y, Grütter D, et al. Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine lake Cadagno a reveal by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiol Ecol*, 2000, **31**: 173-182.
- [11] Felsenstein J. PHYLIP v. 3.62 (phylogenetic inference program package), <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>. University of Washington, Seattle, WA, USA. 2004
- [12] Bowman JP, McCanmon SA, Brown MV, et al. Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**(8): 3068 - 3078.
- [13] Bowman JP, Rea PS, Brown MV, et al. Community structure and psychrophily in Antarctic microbial ecosystems. In: Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P. *Microbial Biosystems: New Frontiers-Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Halifax, Canada: Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, 1999

- [14] Bowman JP , Brown MV , Nichols DS. Biodiversity and ecophysiology of bacteria associated with Antarctic sea ice. *Antarctic Science* , 1997 , 9(2) : 134 – 142.
- [15] Stackebrandt E , Goebel BM. Taxonomic note : a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* , 1994 , 44(4) : 846 – 849.

Phylogenetic diversity and cold-adaptive hydrolytic enzymes of culturable psychrophilic bacteria associated with sea ice from high latitude ocean , Arctic

YU Yong* , LI Hui-rong , CHEN Bo , ZENG Yin-xin , HE Jian-feng

(State Oceanic Administration Key Laboratory for Polar Science , Polar Research Institute of China , Shanghai 200136 , China)

Abstract : The phylogenetic diversity of culturable psychrophilic bacteria associated with sea ice from high latitude sea (77°30'N ~ 81°12'N) , Canadian Basin and Greenland sea Arctic , was investigated. A total of 37 psychrophilic strains were isolated using three different methods of (i) spread plate method : 100 μ L of each dilution ice-melt sample was spreaded onto the surface of Marine 2216 agar (DIFCO laboratories , Detroit , MI) and incubated for 2 to 6 weeks at 4°C ; (ii) bath culture and spread plate method : 1mL of sample was added to 9mL of NSW (unamended natural seawater , 0.2 μ m prefiltered and autoclaved) and incubated for 1 months at - 1°C , then spread plate method was used to isolate bacterial strains from the pre-cultured samples ; (iii) cold shock , bath culture and spread plate method : samples were exposed to - 20°C for 24h , then bacterial strains isolated by bath culture and spread plate method under aerobic conditions. Nearly half of psychrophilic strains are isolated by using method iii . 16S rDNA nearly full-length sequence analysis reveal that psychrophilic strains fall in two phylogenetic divisions , γ -proteobacteria (in the genera Colwellia , Marinobacter , Shewanella , Thalassomonas , Glacielcola , Marinomonas and Pseudoalteromonas) and Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides (in the genera Flavobacterium and Psychroflexus). Nine of bacterial isolates (BSi20007 , BSi20497 , BSi20517 , BSi20537 , BSi20170 , BSi20001 , BSi20002 , BSi20675 and BSi20101) quite likely represent novel species (16S rDNA sequence similarity below 97%). One of strains (BSi20002) from Canadian Basin shows 100% sequence similarity to the Antarctic Weddell sea ice isolate Marinobacter sp. ANT8277 , suggesting bacteria may have a bipolar distribution at the species level. AF283859 sequences were submitted to the BLAST search program of the National Center for Biotechnology Information website (NCBI , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Twenty sequences showing 100% similarity each other are retrieved from the database , eleven from Antarctic seawater bacteria , three from Antarctic sea-ice bacteria , one from Spitzbergen sea-ice bacteria , two from Chukchi Sea sea-ice bacteria , two from Canadian Basin sea-ice bacteria (in this study) and one from uncultured bacterium clone PDA-OTU11 associated with the coral Pocillopora damicornis from the Great Barrier Reef. These may indicate that the physiological and geographic barriers appear to be permeable and some bacterial species can survive in different environment. The majority of the bacterial strains are able to secrete diversity cold-adaptive hydrolytic enzymes into the medium at 4°C . The isolates that are able to degrade Tween-80 , glutin , and starch account for , respectively , 62.6% , 51.4% and 40.5% .

Keywords : Arctic ; Sea ice ; Psychrophilic ; Phylogenetic diversity ; Cold-adaptive hydrolytic enzymes

Foundation item : Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719601) ; National Natural Science Foundation of China (30500001 , 40376001) ; Marine Science Fund for Young Scientists , SOA (2005112) ; S&T Basic Work Program (2003DEB5J057)

* Corresponding author. Tel : 86-21-58711026 ; Fax : 86-21-58711663 ; E-mail : yurenny77@vip.sina.com

Other author : CAI Ming-hong

Received : 22 August 2005 / Accepted : 12 October 2005 / Revised : 22 December 2005