

天山1号冰川底部沉积层产 β -半乳糖苷酶低温菌株的系统发育分析及生理多样性

张明¹, 顾燕玲¹, 徐宇丽¹, 史学伟¹, 郑晓吉¹, 周红¹, 倪永清^{1,2*}

¹ 石河子大学食品学院, 石河子 832000

² 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

摘要:【目的】通过对天山1号冰川底部沉积层冻土中细菌的分离和产 β -半乳糖苷酶低温菌株的筛选, 了解天山冻土微生物的物种多样性, 并对产 β -半乳糖苷酶低温菌株的系统发育和生理多样性进行分析。【方法】以乳糖为主要碳源, X-Gal为显色剂, 分离筛选出产低温 β -半乳糖苷酶菌株。对细菌常规生理生化实验、最适生长温度、耐盐性、药物敏感性进行测定。根据16S rRNA基因序列初步确定产 β -半乳糖苷酶低温菌种的系统进化地位, 并采用BOX-PCR指纹图谱技术对16S rRNA基因高度同源性的菌株进一步区分。【结果】分离到90株可培养低温菌中25株可产 β -半乳糖苷酶, 其中76%为革兰氏阳性菌。依据生长温度, 产酶菌株80%为嗜冷菌, 20%为耐冷菌。在系统发育上, 产酶菌株隶属于4个类群, 其中肠球菌属(*Enterococcus*)占26%, 短波单胞菌属(*Brevundimonas*)占22%, 假单胞菌属(*Pseudomonas*)占13%。【结论】天山1号冰川底部沉积层冻土中产 β -半乳糖苷酶的低温细菌具有比较丰富的物种和生理多样性。

关键词: 天山冻土, 低温菌株, β -半乳糖苷酶, BOX-PCR

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2011)12-1605-11

β -半乳糖苷酶, 俗称乳糖酶, 可来源于植物、动物和微生物, 它能够催化 β -半乳糖苷化合物中 β -半乳糖苷键发生水解, 还具有转半乳糖苷的作用^[1]。乳糖是牛乳中最主要的碳水化合物, 含量约为4.5% - 5.0%^[2], 但是乳糖不能被人体直接吸收利用, 必须经体内小肠黏膜细胞分泌的乳糖酶水解乳糖为葡萄糖和半乳糖才能够被机体利用, 有些人群体内乳糖酶缺乏, 摄入牛乳或乳制品后, 乳糖不能被分解而直接进入血液, 称为乳糖吸收不良^[3]。当乳

糖进入结肠后, 被细菌发酵产生短链有机酸和甲烷、H₂、CO₂等气体, 此过程可能引起肠鸣、腹痛、直肠气体和渗透性腹泻, 存在这些症状时称为乳糖不耐受症(Lactose intolerance)^[4]。

目前, 解决乳糖不耐症的最佳方法是用乳糖酶水解乳糖来生产低乳糖或者无乳糖乳制品, 现在商业化的乳糖酶大多是中温乳糖酶, 酶的最适反应温度是37℃左右或者更高^[5]。对于乳品加工工业, 许多长时间的操作工艺以及贮存和运输都是在低温

基金项目: 国家自然科学基金(40961002); 中国博士后科学基金特别资助(201003339); 中国博士后科学基金面上项目(20090450848); 教育部科学技术研究重点项目(210250); 冻土工程国家重点实验室开放基金项目(SKLFSE200903); 新疆兵团博士资金专项(2011BB009); 石河子大学高层次人才计划项目(RCZX200820); 石河子大学研究生创新基金项目(YJXC2010-Y14)

* 通信作者。Tel: +86-993-2058095; Fax: +86-993-2058093; E-mail: niyqlzu@sina.com

作者简介: 张明(1985-)男, 陕西丹凤人, 硕士研究生, 主要从事食品生物技术方向研究。E-mail: shzuzm2009@163.com

收稿日期: 2011-08-10; 修回日期: 2011-10-07

(4℃以下)进行^[6],在低温下这些中温酶的催化效率很低,使它们的应用受到限制。低温β-半乳糖苷酶在较低温度下具有高活性,被应用在乳品加工和治理由乳清引起的环境污染^[7],有着常温乳糖酶无法比拟的优越性。目前,国内外报道分离筛选的产低温β-半乳糖苷酶菌株主要来自于极地和深海,多数为细菌^[8-11],少数为酵母^[12]。这些菌株既有嗜冷菌、又有耐冷菌,最适生长温度大多在15℃-25℃,有的甚至在0℃也能生长,因此嗜冷或者耐冷微生物是低温β-半乳糖苷酶最主要的潜在来源。最近对分离菌株有关低温活性的β-半乳糖苷酶功能基因克隆和产物表达的研究进行了报道^[13-14]。

天山冻土属于我国高海拔高山常年冻土,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,为冻土微生物生理多样性提供了可能。本文研究了天山1号冰川底部沉积层永久冻土中产低温β-半乳糖苷酶菌株的筛选、纯化,并对筛选出的产β-半乳糖苷酶低温菌株的系统发育和生理多样性进行了详细的研究,以期解决乳糖不耐症、提升我国乳制品产业的产业附加值提供新思路、新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器:用于PCR扩增的试剂购自TaKaRa公司,扩增引物由Invitrogen公司合成,相关生理生化试验所用试剂购自索来宝公司,高速冷冻离心机为Eppendorf公司5810R型,PCR仪为Techne公司TC-512;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。

1.1.2 培养基:①平板分离培养基:1/10×TSA(BD公司),1/4×R2A(Difco);②液体富集培养基:1/4×TSB;③斜面保存培养基:1/4×TSB培养基,1.5%琼脂;④产酶菌株筛选培养基:1/4×TSA(0.01% X-Gal, 0.1 mmol/L isopropylthio-β-D-galactoside,琼脂1.5%);以上培养基PH值均为7.2,121℃灭菌20 min。

1.2 样品采集

样品于2010年7月22日采自新疆天山1号冰

川尾部的底部沉积层,海拔3833 m(43°07.125N, 86°48.707E)。沿5.0 m高的冰剖面每隔40 cm取样,将底部冻土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后,在超净工作台上削去表层可能受到污染的样品,于-20℃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。

1.3 菌株的分离与纯化

采用富集法和直接稀释涂布平板法对土壤样品进行菌种分离,10℃培养7-15 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、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β-半乳糖苷酶菌株筛选

经液体培养基增菌后,选择适宜的纯培养物稀释菌液点接在1/4×TSA琼脂平板(X-Gal 0.01%)上,以菌落蓝白色作为初筛依据,选取显蓝色的菌株于斜面培养基4℃保存。

1.5 产低温β-半乳糖苷酶菌株生长特性测定

菌株最适生长温度测定:分别置于4℃、10℃、15℃、18℃、21℃、24℃、30℃、37℃八个温度条件下,培养24 h后测OD₄₂₀值。

菌株最适耐盐性测定:在液体培养基中分别加入0.4%、6%、8%、12%、16%六个浓度的氯化钠溶液,18℃培养1周后,测OD₄₂₀值。

1.6 16S rRNA 基因PCR扩增和系统进化分析

根据参考文献[8]的方法提取单菌落DNA,应用细菌16S rRNA基因通用引物(正向引物27f:5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3',反向引物1492r:5'-CTACGGCTACCTTGT AC GA-3')进行PCR扩增,PCR反应条件为:95℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,30个循环。PCR产物纯化后,由上海生工生物科技有限公司采用正向扩增引物直接测序。将测序结果提交到GenBank数据库中,序列同源性分析利用BLAST在线进行。从数据库获得相关属、相关种的16S rRNA基因序列,建立系统发育树。用CLUSTAL X 1.83软件把序列进行排列^[15],用邻接法neighbor-joining method^[16]计算进化距离,采用p-distances法和Kimura-2parameter双参数法进行,进化树分支模式的稳定性用MEGA v. 4.0^[17]软件分

析,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'-CTACGGCAAGGC GACGCTGACG-3')进行 PCR 扩增^[18],取 10 μ L 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶、0.5 \times TBE 电泳缓冲液、4 V/cm 条件下电泳检测 3 h。根据 PCR 扩增产物指纹带谱的有无,在统计分析中将条带转化为只含有 1 和 0 两值变量的矩阵,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 产低温 β -半乳糖苷酶菌株生理生化鉴定

参照文献[19]对产低温 β -半乳糖苷酶菌株进行了 7 种常规的生理生化鉴定实验,以及 19 种不同碳源的利用实验,菌株生长温度设为 18 $^{\circ}$ C。

1.9 药敏试验

本次实验根据美国临床实验室标准委员会 (NCCLS)^[20] 标准,采用琼脂扩散纸片法 (K-B) 对产酶菌株的耐药性进行测定,包括 3 种氨基糖苷类:链霉素 (Streptomycin, STM)、庆大霉素 (Gentamicin, GEN)、卡那霉素 (Kanamycin, KAN); 青霉素 (Penicillin, PEN)、氨苄西林 (Ampicillin, AMP); 四环素 (Tetracycline, TET); 氯霉素 (Chloramphenicol, CLM); 大环内脂类:红霉素 (Erythromycin, ERM); 头孢菌素类:头孢噻肟 (Cefotaxime, CTX); 以及去甲万古霉素 (Norvancomycin, NVA)、利福平 (Rifampicin, RIF) 和杆菌肽 (Bacitracin, BAT) 共 12 种临床常用抗生素药物进行试验,具体方法参见文献[21]。

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初步从冻土样品中共分离得到 90 株可培养物。选择培养基筛选结果表明:90 株菌株中有 25 株菌株能在加入 X-Gal 中的 TSB 琼脂平板上显蓝色,产酶菌株全为杆菌,大部分为乳白色,部分透明,仅菌株 m12-1 为土黄色菌落,菌株 R11、A10、L3-2 菌落形态较大。革兰氏染色结果表明 25 株产低温 β -半乳糖苷酶菌株中有 19 株为革兰氏阳性菌,占总数的 76%; 6 株为革兰氏阴

性菌,占总数的 24%,菌落和细胞形态见表 1。

2.2 产酶菌株的最适生长温度与耐盐性

表 1 实验结果表明:产酶菌株中有 80% 的菌株最适生长温度为 15 $^{\circ}$ C,最高生长温度为 24 $^{\circ}$ C; 20% 的菌株最适生长温度为 24 $^{\circ}$ C,最高生长温度为 37 $^{\circ}$ C。76% 的产酶菌株最高耐盐浓度为 6%, A35、y9-2 和 y31 耐盐性较差,最高耐盐度 4%; 菌株 a11、A15 和 m12-1 耐盐性较高,在 8% 盐浓度下仍可生长,高于 12% 条件下生长缓慢,几乎停止生长。

2.3 基于部分 16S rRNA 基因序列的产酶菌株系统发育分析

将天山冻土中分离筛选出的产 β -半乳糖苷酶低温菌株的部分 16S rRNA 基因序列提交 NCBI,通过 BLAST 工具在 GenBank 数据库中与已发表的 16S rRNA 基因序列进行同源性比对,并选取同源性最高的序列构建系统发育树(图 1)。由系统发育树可知 25 株产酶菌株分属于 α 变形细菌亚纲 (Alpha-Proteobacteria)、 β 变形细菌亚纲 (Beta-Proteobacteria)、 γ 变形细菌亚纲 (Gamma-Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 4 个系统发育类群,包括 *Pseudomonas*、*Klebsiella*、*Stenotrophomonas*、*Polaromonas*、*Paenibacillus*、*Enterococcus*、*Methylobacterium*、*Brevundimonas* 共 8 个属。菌株 A30、R2-2、D3-1、A10、L3-2 和 A15 都属于 γ 变形细菌亚纲 (Gamma-Proteobacteria),其中菌株 A30、R2-2 和 D3-1 隶属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 与已知种 *Pseudomonas reactans* 和 *Pseudomonas synxantha* 系统发育关系最接近,菌株 R2-2 与 *Pseudomonas japonica* (AB126621) 的序列同源性最高,而菌株 A10 和 L3-2 属于 *Klebsiella* 属,菌株 A15 属于 *Stenotrophomonas* 属。菌株 A35、A26、y14、a12、R60 和 y9-2 属于 α 变形细菌亚纲 (Alpha-Proteobacteria),其中菌株 A35 在数据库中与已知种 *Methylobacterium extorquens* DM4 (FP103042) 序列相似性最高也只有 95%,很可能代表一新属或新种;菌株 a12、R60 和 y9-2 在系统发育上与 *Brevundimonas vesicularis* 关系最近,菌株 A26 和 y14 隶属于 *Brevundimonas* 属。菌株 y6 和 G3 隶属于 *Polaromonas* 属,属于 β 变形细菌亚纲 (Beta-Proteobacteria)。菌株 m12-1 属于厚壁菌门 (Firmicutes) 与 *Paenibacillus polymyxa* 的 16S rRNA 基因序列相似性达到 100%,可确定隶属于该种;而菌株 a11、y31、A36、R2-3、E05-1 和 y20 属于厚壁菌门 (Firmicutes) 的 *Enterococcus*。

表1 天山1号冰川底部沉积层冻土中产 β -半乳糖苷酶低温菌株的特征Table 1 Characteristics of cold-adapted β -galactosidase-producing strains isolated from the bottom layer of the No. 1 Glacier deposits in the Tianshan Mountains

Strain	Growth characteristics		Phylogenetic affiliations		Morphological properties		
	Range temp/°C	Range NaCl/%	Closest relative species	Similarity /%	Cell shape	Gram staining	Colony description
R60	4 - 15 ^a - 24	0 - 6	<i>Brevundimonas</i> sp. HLA (EF143837)	98	Rod	G ⁺	White, medium
A30	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Pseudomonas reactans</i> (FJ972537)	99	Rod	G ⁺	White, medium
A26	4 - 24 - 37	0 - 6	<i>Brevundimonas</i> sp. V4. BP. 05	99	Rod	G ⁺	Transparent, small
G3	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Polaromonas</i> sp. GM1 (EU106605)	98	Rod	G ⁻	Transparent, small
D3 - 1	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Pseudomonas</i> sp. ps4 - 4 (AY303304)	99	Rod	G ⁺	White, medium
y9 - 2	4 - 24 - 37	0 - 4	<i>Brevundimonas</i> sp. HLA (EF143837)	97	Rod	G ⁺	White, small
y6	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Polaromonas</i> sp. 1024 (EF423333)	99	Rod	G ⁺	White, medium
a11	4 - 24 - 37	0 - 8	<i>Enterococcus durans</i> (AY057055)	99	Rod	G ⁺	White, medium
R11	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Pseudomonas</i> sp. HX32	100	Rod	G	White, large
m12 - 1	4 - 15 - 24	0 - 8	<i>Paenibacillus polymyxa</i> EBL2071 (EF545556)	99	Rod	G ⁻	Yellow, medium
R2 - 2	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Pseudomonas japonica</i> (AB126621)	98	Rod	G ⁺	White, medium
A35	4 - 15 - 24	0 - 4	<i>Methylobacterium extorquens</i> DM4 (FP103042)	99	Rod	G ⁺	White, medium
y9 - 1	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Rhodococcus yunnanensis</i> 1P10PD	99	Rod	G ⁻	Transparent, medium
a12	4 - 24 - 37	0 - 6	<i>Brevundimonas</i> sp. N4 (EU567033)	99	Rod	G ⁺	White, medium
Rs - 8	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Cryobacterium</i> sp. ER1	99	Rod	G ⁺	Transparent, medium
y14	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (AJ227781)	97	Rod	G ⁺	White, medium
y20	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Enterococcus faecium</i> (HM058557)	98	Rod	G ⁺	White, medium
y31	4 - 15 - 24	0 - 4	<i>Enterococcus faecium</i> (GU904683)	98	Rod	G ⁺	White, small
M15	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	Rod	G ⁺	White, small
A15	4 - 15 - 24	0 - 8	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (AB461023)	99	Rod	G ⁺	White, small
A10	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Klebsiella oxytoca</i> (AY873801)	98	Rod	G ⁻	White, large
L3 - 2	4 - 24 - 37	0 - 6	<i>Klebsiella oxytoca</i> (HQ242727)	98	Rod	G ⁻	White, large
E05 - 1	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Enterococcus</i> sp. CCGE3067	97	Rod	G ⁺	White, medium
A36	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Enterococcus faecium</i> (HQ721257)	98	Rod	G ⁺	Transparent, small
R2 - 3	4 - 15 - 24	0 - 6	<i>Enterococcus</i> sp. (EU867322)	97	Rod	G ⁺	White, medium

Note: ^a: The optimal growth temperature.

2.4 产酶菌株 rep-PCR 指纹聚类分析

由图2可以看出产酶菌株的BOX-PCR指纹图谱产生的条带较多,能够反映不同菌株在基因组水平上的差异。指纹图谱聚类分析树状图(图3)显示在75%的相似性水平上,所有菌株可以划分为6个类群(Group):属于Group1的菌株E05-1、y20、y31、R2-3、A36和a11,系统发育上隶属于*Enterococcus*,其中R2-3和A36的特征条带较相近,E05-1、y20和y31的特征条带完全相同,例外的是菌株*Methylobacterium* sp A35在90%的相似性水平上也被聚类Group1中;Group2中m12-1和M15属于*Paenibacillus*,特征条带较相近;Group3由G3和y6组成,隶属于*Polaromonas*;Group4包括A30、R2-2和D3-1,同属于*Pseudomonas*,其中R2-2和D3-1相似性较高,而A30差异性较大;Group5中所有菌株均属于*Brevundimonas*,其中y14和A26有较高的相似性,而a12和R60表现出较大

的差异性;Group6中所有菌株均属于*Klebsiella*,其中A10和y9-1特征条带较相近,L3-2和R11条带完全相同。

2.5 产酶菌株典型生理生化特征

对产酶菌株进行了7种常见的生理生化试验,结果如表2所示:在吲哚试验显阳性的菌株占93.1%,明胶水解试验显阳性的菌株仅有13.8%;菌株A30、R2-2和D3-1同属于*Pseudomonas*,但只有A30明胶水解试验中显阳性,相反在M.R试验中,R2-2为阴性,A30和D3-1均为阳性;菌株A10和L3-2同属于*Klebsiella*,A10在硝酸盐还原中显阴性,在V-P中显阳性,而L3-2则相反;菌株y6和G3同属于*Polaromonas*,y6的明胶水解显阴性,而G3却显阳性;菌株a11、y31和E05-1同属于*Enterococcus*,但只有y31的过氧化氢试验显阳性,只有E05-1的明胶水解显阳性;菌株A26和y9-2同属于*Brevundimonas*,A26在过氧化氢试验中显阴

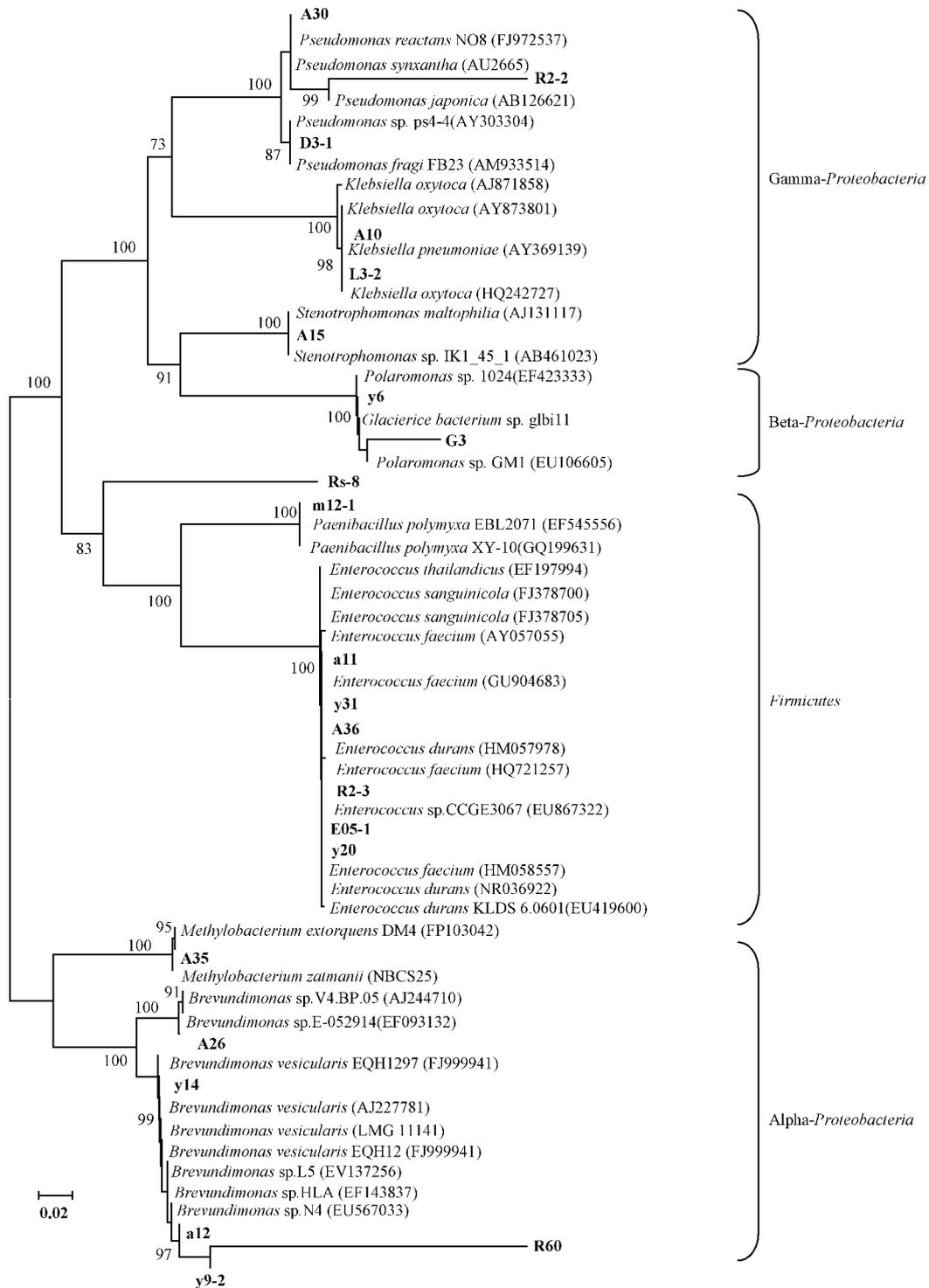


图 1 基于部分 16S rRNA 基因序列的产 β -半乳糖苷酶低温菌株系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships among β -galactosidase-producing strains 16S rRNA gene partial sequences and their closely related sequences downloaded from GenBank.

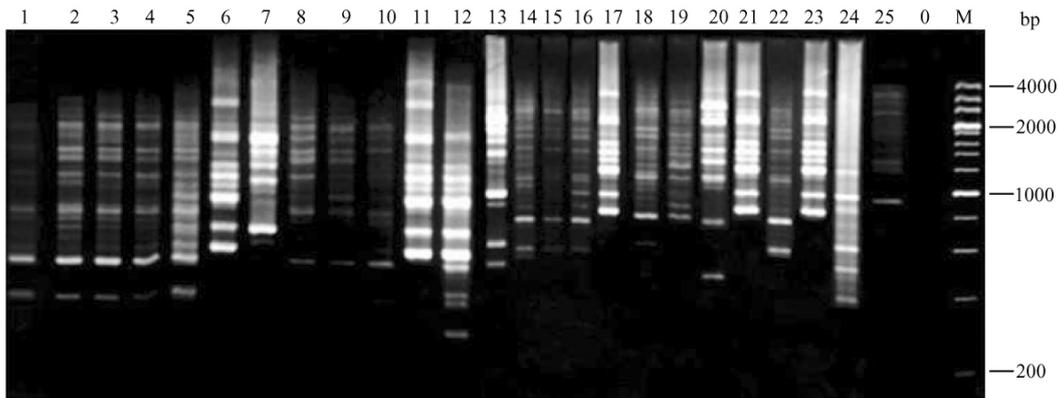


图2 产低温 β -半乳糖苷酶菌株的BOX-PCR指纹图谱

Fig. 2 BOX-PCR fingerprint patterns of isolates in 1% agarose. Lanes: 1, A35; 2, E05-1; 3, y20; 4, y31; 5, R2-3; 6, y14; 7, A30; 8, Rs-8; 9, G3; 10, y9-2; 11, A10; 12, y9-1; 13, M15; 14, A36; 15, D3-1; 16, R2-2; 17, a12; 18, a11; 19, y6; 20, A15; 21, L3-2; 22, A26; 23, R11; 24, m12-1; 25, R60; 0, blank; M, mark 4000bp ladder.

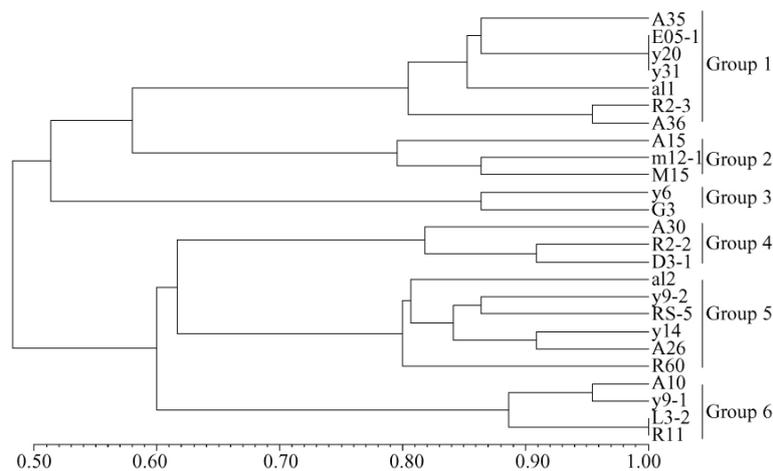


图3 BOX-PCR指纹图谱聚类分析树状图

Fig. 3 The dendrogram obtained by cluster analysis of the BOX-PCR fingerprinting data.

性,而y9-2则显阳性。

对产酶菌株进行的19种碳源试验,包括了13种糖类、2种盐类、2种醇类、1种蛋白和1种酸类,由表2可知:*Stenotrophomonas*不能利用半乳糖;*Pseudomonas*和*Paenibacillus*不能利用蔗糖;*Klebsiella*不能利用蔗糖、麦芽糖、木糖、棉子糖、海藻糖、纤维素二糖;同属*Polaromonas*的菌株G3和y6都不能利用蔗糖,但G3能利用半乳糖,不能利用阿拉伯糖和盐类,而y6则相反;*Methylobacterium* sp. A35除了蔗糖和阿拉伯糖外,能利用其它所有的碳源。根据图4统计结果显示:所有的产酶菌株都能以甘露糖、鼠李糖和山梨糖为碳源生长,菌株所占比例最高,其次是果糖;利用蔗糖做为碳源的菌株所占比例最少。而且菌株对同类碳源的利用也有差异

性,譬如能利用甘露醇的菌株比例要高于山梨醇,能利用草酸盐的菌株比例要高于苯甲酸盐。

2.6 药敏试验

对产酶菌株进行了12种抗生素药敏试验,图5-A是菌株y14对头孢氨噻肟(CTX)、四环素(TET)、利福平(RIF)和杆菌肽(BAT)的K-B纸片扩散结果,图5-B是菌株A30对卡那霉素(KAN)、庆大霉素(GEN)、青霉素(PEN)和链霉素(STM)的K-B纸片扩散结果。

依据NCCLS对实验进行详细分析发现(资料未显示):分离产酶菌株*Pseudomonas* spp.对头孢氨噻肟和杆菌肽产生耐药,而对庆大霉素和卡那霉素敏感,其中菌株A30和D3-1对红霉素、氨苄西林、青霉素耐药,而R2-2对其敏感;A30对链霉素、氯霉

表 2 产 β -半乳糖苷酶低温菌株的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of cold-adapted β -galactosidase-producing strains

Physiological test	R60	A30	A26	G3	D3-1	y9-2	y6	al1	R11	m12-1	R2-2	A35	y9-1	al2	Rs-8	y14	y20	y31	M15	A15	A10	L3-2	E05-1	A36	R2-3	
Gelatin liquefaction	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
Hydrogen sulfide test	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
Nitrate reduction	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Indole test	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
Catalase	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1
M. R	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
V-P	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Sucrose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Xylose	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Rhamnose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Arabinose	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
Sorbitose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casein	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Mannitol	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Citric acid	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Benzoate	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Carbonite	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Note: 0, negative; 1, positive; +, growth; -, no growth.

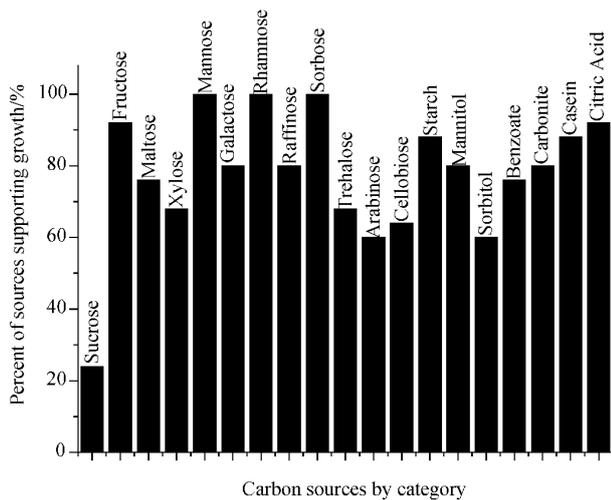


图4 25株产 β -半乳糖苷酶低温菌株对不同碳源的利用率

Fig. 4 Frequency of growth on carbon sources. 25 strains producing cold-active β -galactosidase were tested for their ability to grow on 19 Carbon sources.

素和去甲万古霉素敏感,而 D3 - 1 对其耐药。*Klebsiella spp.* 对红霉素、杆菌肽产生耐药,而对链霉素、氯霉素、四环素、庆大霉素和卡那霉素敏感,其中菌株 A10 对头孢氨噻肟敏感,对利福平耐药,而 L3 - 2 则相反。*Polaromonas spp.* 对头孢氨噻肟和杆菌肽产生耐药,对红霉素、链霉素、氨苄西林、庆大霉素、去甲万古霉素和卡那霉素敏感,其中菌株 y6 对四环素耐药,对青霉素敏感,而 G3 则相反;*Enterococcus spp.* 对杆菌肽产生耐药,对氯霉素、庆大霉素和卡那霉素敏感;*Brevundimonas spp.* 对杆菌肽产生耐药,对庆大霉素和卡那霉素敏感。

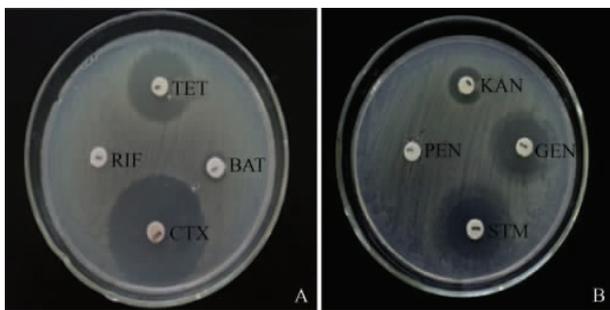


图5 菌株 y14 (A) 和 A30 (B) 的 K-B 纸片扩散结果

Fig. 5 Kirby-Bauer disk diffusion results of strains y14 (A) and A30 (B).

产酶菌株对不同抗生素的药敏实验结果统计如图6所示:所有菌株均对杆菌肽产生耐药性,而对庆大霉素敏感;对头孢氨噻肟、利福平、氨苄西林、青霉

素和杆菌肽产生耐药性的菌株比例明显高于对其敏感的菌株比例,对红霉素、链霉素、氯霉素、去甲万古霉素、四环素和卡那霉素产生耐药性的菌株比例明显低于对其敏感的菌株比例;对卡那霉素产生耐药性的菌株比例与对其产生中度敏感的比例相同。

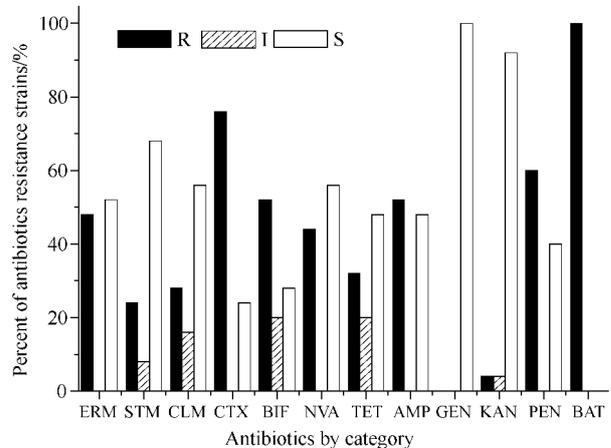


图6 产低温 β -半乳糖苷酶菌株对不同抗生素的敏感性

Fig. 6 Susceptibility of the cold-active β -galactosidase producible strains to different antibiotics.

3 讨论

近年来,国内外对于低温酶的研究广泛开展,具有低温活性的 β -半乳糖苷酶大多是由低温微生物产生,它们主要分布在一些极端环境中,如南北极、深海、冰川等低温环境^[22]。本研究中的冻土样品来自于天山1号冰川底部沉积层,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,本实验采用1/4、1/10 \times TSB^[23],分离效果良好。此外,对产酶菌株进行的19种碳源试验结果表明,一些分离菌株碳源利用单一,如*Pseudomonas*、*Polaromonas*和*Paenibacillus*属不能利用蔗糖;*Klebsiella*属不能利用蔗糖、麦芽糖、木糖、棉子糖、海藻糖、纤维素二糖,仅能利用蛋白类和盐类,这很可能是沉积层冻土中大多数微生物不能分离得到纯培养物的一个原因,更多的微生物在营养成分的利用上很可能形成了较为复杂的代谢物食物链关系^[24],虽然在长期进化的过程中生存下

来,但很难利用各种合成培养基中的碳源。

已报道^[25]的低温 β -半乳糖苷酶产生菌既有嗜冷菌又有耐冷菌,根据Morita^[26]对嗜冷菌(Psychrophile)和耐冷菌(Psychrotrophs)的定义,本试验中80%的产酶菌株为嗜冷菌,最适生长温度为15℃-18℃,最高生长温度不超过24℃,这与沉积层冻土永久处于0℃以下的环境相一致。只有少量菌株能在较广的温度范围内生长,例如菌株A26、a11、L3-2等,生长范围在4℃-37℃之间,这些耐冷菌很可能是表层融水带到底部沉积层冻土的喜温微生物在冰川低温环境下长期选择进化的结果。耐盐性试验结果显示,76%的产酶菌株最高耐盐浓度为8%,说明天山冻土中产低温 β -半乳糖苷酶菌株大多数属于轻度嗜盐菌。

冻土中细菌对抗生素的多重耐药性(MDR, multidrug-resistant,对多种结构完全各异的抗生素同时产生耐药性)近年来受到人们的关注^[27]。本研究中,产酶菌株*Stenotrophomonas* sp. A15对红霉素、链霉素、氯霉素、头孢氨噻肟、四环素、氨苄西林共6种类型的抗生素同时具有耐药性,菌株*Paenibacillus* sp. m12-1、*Pseudomonas* sp. D3-1也具有多重耐药性,说明嗜低温微生物也存在广泛的多重耐药性现象。一种可能的解释是,冻土环境条件下也存在抗生素抗性决定基因的水晶转移,另一种假说认为多重耐药性产生于远古的非冷冻环境,因此对冻土中不同耐药机制的产生机理需做系统研究^[27]。此外,研究发现具有抗生素抗性的菌株大多为革兰氏阳性菌,与之前西伯利亚冻土中的研究报道相一致^[27-29]。

本研究从天山冻土中分离筛选出的产酶菌株分布于4个系统发育类群、8个属,其中贡献最大的是*Enterococcus*,占总数的26%,其次是*Brevundimonas*属,占21.7%。研究结果显示,虽然隶属于同一属的菌株其16S rRNA基因序列相似性很高,但其形态特征、生理生化特征有明显差异,因此同一种属的产酶菌株不能仅仅依据16S rRNA基因序列相似性来区分,应该结合表型特征、分子指纹技术以及更精确的多基因序列来区分,进而筛选到高效的产酶菌株^[30]。例如菌株A10和L3-2隶属于*Klebsiella*,虽然16S rRNA基因序列相似性极高,但表型特征差异很大,在硝酸盐还原试验中,A10显阴性,而L3-2显阳性;在V-P试验中,A10显阳性,而L3-2显

阴性;A10不能以果糖为碳源,但可以山梨醇为碳源,而L3-2刚好相反。菌株E05-1、y20、y31、R2-3、A36和a11属于*Enterococcus*,虽然16S rRNA基因序列同源性也很高,但依据BOX-PCR指纹图谱技术明显可区分为3个亚群,其中菌株R2-3和A36的特征条带较相近,E05-1、y20和y31的特征条带完全相同,而菌株a11则差异性更大,这与其生理生化特征差异基本相一致,很可能这些菌株隶属的类群分别代表了不同的种,有待于分离更多的纯培养物深入开展研究。此外,本研究冻土样品取自天山1号冰川底部沉积层,由冰水土混合形成了一个独特的寡营养微环境,因此有必要从冰川周边营养物相对丰富的冻土层取样分离菌株开展比较研究,在不同空间尺度上分离菌株,研究产低温 β -半乳糖苷酶菌株的遗传多样性和生理多样性,以便筛选到高效的产酶菌株。下一步我们将通过宏基因组学方法,开展 β -半乳糖苷酶基因的多样性研究,克隆 β -半乳糖苷酶基因,进而为耐低温 β -半乳糖苷酶的应用奠定理论基础。

参考文献

- [1] 卢丽丽,肖敏,徐晓东. 转糖基 β -半乳糖苷酶产生菌*Enterobacter agglomerans* B1: 筛选鉴定、发酵产酶及其合成低聚半乳糖的研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(1): 38-44.
- [2] 谭树华,高捷,海迪勒,尚新燕,高向东,吴梧桐. 酵母菌药用乳糖酶制备新方法. 中国药科大学学报(*Journal of China Pharmaceutical University*), 2004, 35(1): 86-89.
- [3] Mahoney RR. Galactosyl-oligosaccharide formation during lactose hydrolysis: a review. *Food Chem*, 1998, 63(2): 147-154.
- [4] 李玉强,王昌禄,顾小波. β -半乳糖苷酶的研究与应用. 中国食品添加剂(*China Food Additives*), 2001, (2): 30-34.
- [5] Nicholas P. Beta-Galactosidase Activity in psychrotrophic Microorganisms and their Potential use in Food Industry. *Czech Food Sciences*, 2002, 20: 43-47.
- [6] Karasova-Lipovova P, Strnad H, Spiwok V, Mala S, Kralova B, Russell NJ. The cloning, purification and characterization of a cold-active β -galactosidase from the psychrotolerant Antarctic bacterium *Arthrobacter* sp. C2-2. *Enzyme Microbiology Technology*, 2003, 33: 836-844.

- [7] Hoyoux A , Jennes AL , Dubois P , Genicot S , Dubail F , Francois JM , Baise E , Feller G , Gerday C. Cold-adapted β -galactosidase from the Antarctic Psychrophile *Pseudoalteromona haloplanktons*. *Applied and Environment Microbiology* , 2001 , 67 : 23-45.
- [8] Nakagawa T , Fujimoto Y , Uchino M. Isolation and characterization of psychrotrophs producing cold-active β -galactosidase. *Applied and Environment Microbiology* , 2003 , 37 : 154-157.
- [9] James A. Protein engineering of a cold-active β -galactosidase from *Arthrobacter* sp. SB to increase lactose hydrolysis reveals new sites affecting low temperature activity. *Extremophiles* , 2006 , 10 : 512-524.
- [10] Coombs JM , Brenchley JE. Biochemical and phylogenetical analyses of a cold-active β -galactosidase from the lactic acid bacterium *Carnobacterium piscicola* BA. *Applied and Environment Microbiology* , 1999 , 65 : 5443-5450.
- [11] Xu K , Tang X , Gai Y , Mehmood M , Xiao X , Wang F. Molecular characterization of cold-inducible beta-galactosidase from *Arthrobacter* sp. ON14 isolated from Antarctica. *J Microbiol Biotechnology* , 2011 , 21 (3) : 236-242.
- [12] Song Chunli , Liu Guanglei , Xu Jinli , Chi Zhenming. Purification and characterization of extracellular β -galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-4 isolated from sea sediment in Antarctica. *Process Biochemistry* , 2010 , 45 : 954-960.
- [13] Bialkowska AM , Ciesliński H , Nowakowska KM , Kur J , Turkiewicz M. A new beta-galactosidase with a low temperature optimum isolated from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 20B: gene cloning , purification and characterization. *Archives Microbiology* , 2009 , 191 (11) : 825-835.
- [14] Hildebrandt P , Wanarska M , Kur J. A new cold-adapted beta-D-galactosidase from the Antarctic *Arthrobacter* sp. 32c-gene cloning , overexpression , purification and properties. *BMC Microbiolog* , 2009 , 27 (9) : 151-161.
- [15] Thompson JD , Gibson TJ , Plewniak F , Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* , 1997 , 25 : 4876-4882.
- [16] Saitou N , Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biollogy Evolution* , 1987 , 4 : 406-425.
- [17] Tamura K , Dudley J , Nei M , Kumar S. MEGA 4 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4. 0. *Molecular Biollogy Evolution* , 2007 , 24 : 1596-1599.
- [18] Versalovic J , Schneider M , Bruijn FJ. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* , 1994 , 5 : 25-40.
- [19] 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.
- [20] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informantional supplement. 2002 , 21 : 100-112.
- [21] Coleman DC , Pomeroy H , Estridge JK , Keane CT , Cafferkey MT , Hone R , Foster , TJ. Susceptibility to antimicrobial agents and analysis of plasmids in gentamicin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from Dublin hospitals. *Journal of Medical Microbiology* , 1985 , 20 : 157-167.
- [22] Adrienne LH. 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.
- [23] Vishnivetskaya T , Kathariou S , Mcgrath J , Gilichinsky D , Tiedje JM. Low-temperature recovery strategies for the isolation of bacteria from ancient permafrost sediments. *Extremophiles* , 2000 , 4 : 165-173.
- [24] Haruta S , Kato S , Yamamoto K , Igarashi Y. Intertwined interspecies relationships: approaches to untangle the microbial network. *Environmental Microbiology* , 2009 , 11 (12) : 2963-2969.
- [25] Marianna T. Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 22b as a source of cold- adapted β -galactosidase. *Biomolecular Engineer* , 2003 , 20 : 317-314.
- [26] Morita RY. Psychrophilic bacteria. *Bacteriology Reviews* , 1975 , 39 : 144-1671.
- [27] Mindlin SZ , Soina VS , Petrova MA , Gorlenko ZhM. Isolation of antibiotic resistance bacterial strains from eastern siberia permafrost sediments. *Russian Journal of Genetics* , 2008 , 44 (1) : 27-34.
- [28] Vishnivetskaya TA , Petrova MA , Urbance J. Bacterial community in ancient siberian permafrost as characterized by culture and culture-independent methods. *Astrobiology* , 2006 , 6 : 400-414.

[29] Margesin R. Permafrost soils. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.

[30] Rossello-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Reviews*, 2001, 25: 39-67.

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

Ming Zhang¹, Yanling Gu¹, Yuli Xu¹, Xuewei Shi¹, Xiaoji Zheng¹, Hong Zhou¹, Yongqing Ni^{1, 2*}

¹ School of Food Sciences, Shihezi University, Shihezi 832000, China

² Cold and Arid Regions Environmental and Engineering Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

Abstract: [Objective] The purpose of this research is to isolate cold-adapted bacteria producing β -galactosidase from permafrost 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 of psychrotrophic and psychrophilic bacteria. [Methods] By using lactose as the main carbon source and X-Gal as chromogenic agent in the medium, cold-adapted strains producing β -galactosidase were detected. Taxonomic identity and genetic diversity of strains isolated were determined by spatial 16S rRNA gene sequences and rep-PCR fingerprint. In addition, we analyzed the phenotypic differences between strains showing high similarity of 16S rRNA gene sequences, including the optimum growth temperature, salt tolerance, ability to use carbon source and antibiotic resistance spectra. [Results] Of the total 90 cold-adapted bacterial strains isolated, we found 25 strains with β -galactosidase activity, 76% of which were Gram-positive bacteria. According to growth temperature range, 80% of strains producing β -galactosidase were identified as psychrophilic bacteria, 20% as psychrotrophs. Phylogenetically, the β -galactosidase-producing bacterial isolates fell in four groups: subclasses α -, β - and γ - of *Proteobacteria*, and *Firmicutes* phylum. [Conclusion] The results enrich our knowledge on the phylogenetic and physiological diversity of cold-adapted strains producing β -galactosidase in cold environments.

Keywords: Permafrost, Tianshan Mountains, Cold-adapted bacteria, β -galactosidase, BOX-PCR

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40961002), by the General and Special Program of the Postdoctoral Science Foundation of China (20090450848, 201003339), by the key Project of Science and Technique Foundation of Ministry of Education of China (2010250) and by the Program for the High-level Talents in Shihezi University (RCZX200820)

* Corresponding author. Tel: +86-993-2058095; Fax: +86-993-2058093; E-mail: niyqlzu@sina.com

Received: 10 August 2011 / Revised: 7 October 2011