

研究论文

南极阿德雷岛淡水湖沉积物细菌群落研究

王鹏¹ 王风平²

(¹同济大学海洋地质国家重点实验室, 上海 200092
²国家海洋局第三海洋研究所生物工程重点实验室 厦门 361005)

提要 应用样品直接稀释涂布平板法, 从南极阿德雷岛淡水湖沉积物中分离得到 34 株菌, 并进行了生理生化性质检测。根据其 16S rDNA 全长序列所进行的系统发育分析表明, 分离菌株分属于革兰氏阳性菌: 节杆菌 (*Arthrobacter*)、红球菌 (*Rhodococcus*)、葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、gamma 变形细菌 (*Gamma-Proteobacteria*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、不动杆菌 (*Acinetobacter*)、寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas*)、beta 变形细菌 (*Beta-Proteobacteria*)、紫色杆菌 (*Janthinobacterium*)、拟杆菌门 (*Cytophaga Flexibacteria Bacteroides*)、假结核棒杆菌 (*Cytophaga*)、土地杆菌 (*Pedobacter*) 等 9 个属。分离的菌株在 4 °C 条件下能产生多种大分子物质水解酶类, 其中 32% 的菌株能产生脂肪酶, 18% 的菌能够水解明胶或者产生卵磷脂酶。同时对沉积物垂直方向的可培养细菌生物量进行了分析, 表明阿德雷岛企鹅排泄物输入量对微生物分布有较大影响。

关键词 南极 细菌 低温水解酶 企鹅

0 引言

南极微生物参与了南极陆地及海洋的营养循环过程和生物生产过程, 在南极生态与环境系统中具有重要的地位和作用。近年来, 研究者开始对南极大陆的部分土壤样品微生物多样性进行研究以及从土壤中分离和鉴定新的菌种^[1-4], 但是由于缺乏合适的研究体系和样品, 微生物与其他生物 (动物、植物等) 之间以及微生物与环境之间的相互关系研究很少^[5, 6]。南极大陆阿德雷岛位于南极半岛尖端附近的南设德兰群岛的乔治王岛, 属于亚南极区。该岛为企鹅聚集地, 沉积物主要来源于给水区风化剥蚀产物、苔藓地衣的残体以及企鹅粪便和残骨, 该区湖泊沉积物保存完好, 为研究微生物与其它生物及环境相互关系提供了良好的环境, 但是该区湖泊沉积物微生物调查研究还十分有限。

[收稿日期] 2008 年 11 月收到来稿, 2009 年 2 月收到修改稿。

[基金项目] 国家自然科学基金 (40606032)、国家“十一五”大洋专项基金 (DYXM-115-02-2-17)、国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2007CB815904)、同济大学青年优秀人才培养行动计划 (2006KJ56) 资助。

[作者简介] 王鹏, 女, 1978 生。讲师, 博士, 主要从事地质微生物研究。

近年来对环境样品中的微生物调查研究大多采用分子生物学技术, 这种方法能够获得较为全面的微生物信息, 而传统的人工培养方法因为受到培养基成分和培养条件等限制而较少应用。但是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, 可以更好地了解样品中处于活体状态的优势细菌类群, 评估微生物与环境的关系^[7]; 同时对培养获得的细菌进行生理生化及酶学研究, 可以为开发利用微生物资源打下基础。

本文采用传统的培养方法, 在以往分子生物学研究结果基础上^[8], 调查阿德雷岛淡水湖 Y₂湖 1 根含有企鹅粪的沉积物柱状样品的细菌分布规律, 初步分析了可培养细菌分布与企鹅排泄物的相互关系; 同时检测所分离菌株的水解酶产生情况, 为南极微生物利用打下基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集和处理

沉积物柱状样品 Y₂-4 于中国第 18 次南极科学考察 (2001 年 11 月—2002 年 4 月) 期间用 PVC 重力柱方法采集自阿德雷岛淡水湖 Y₂ (62.13°S 58.54°W), 该小型淡水湖水深小于 0.5 m, 海拔高度约 12 m, 南侧邻海, 地势东高西低, 东部 3 个阶地上分布有小型水盆地, 它们是 Y₂湖的供水系统。样品在实验进行之前一直处于 -20 °C 保存。Y₂-4 长 59.5 m, 底部年龄距今 1600 年, 33 m, 18 m 分别距今 1230 年, 1020 年^[5]。以 1 m 为单位分割, 20% 分别装入无菌聚乙烯管中, 用于微生物研究工作。样品总磷含量在以往的研究中已经测定^[3]。

1.2 菌株的分离纯化及生理生化特征分析

称取沉积物样品 1—49 m 每层各 0.5 g 用 0.5% NaCl 水溶液定容至 1 mL, 取 100 μL 悬浮液进行系列稀释, 涂布 LB 平板, 然后在 4 °C 培养 7—14 d 根据菌落形态特征, 挑取单菌落在 LB 平板上 4 °C 培养, 以得到最大的多样性, 单菌落再次纯化后进行保种。

以 LB 培养基作为基础培养基, 制成 0%, 3.4%, 10%, 15% 的 NaCl 培养基进行盐度耐受实验, pH 为 3.0 7.6 9.7 的培养基进行酸碱度耐受实验, 在 0 °C, 15 °C, 30 °C, 37 °C 条件下进行温度耐受实验。氧化酶、过氧化氢酶以及大分子降解实验根据 Brown 等^[9]的方法进行。

1.3 16S rDNA 序列分析

菌株于 LB 培养基中在 10 °C 温度下培养 2 d 后, 应用小量细菌基因组 DNA 快速抽提纯化试剂盒 (上海华舜生物技术有限公司) 抽提菌体总 DNA 作为 PCR 模板 DNA 进行 16S rDNA PCR 扩增。采用细菌特异性引物^[10] Eubaq27F (EF) 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG₃, Eubaq492R (ER) 5'GGT TAC CTT GTT ACG ACT T₃ PCR 采用 50 μL 反应体系, 94 °C 45 s; 55 °C 60 s; 72 °C 90 s 35 个循环。PCR 产物经上海生物技术有限公司胶回收试剂盒纯化后, pMD 18-T 载体 (大连宝生物) 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, 由上海英骏生物技术有限公司测序。

将获得的序列登录 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 应用 BLAST 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+FDB) 中获得的相近序列, 应用 CLUSTALX 1.81 进行多序列匹配对比, 用系统发生推断软件 PHYLIP 3.62 进行统计和聚类分析。采用邻接法 (neighbor joining method) 获得系统进化树, 并通过自举分析 (bootstrap) 进行置信度检测, 自举数据集为 1000 次。

1.4 细菌生物量分析

可培养细菌总数采用平板稀释计数法, 即沉积物样品每厘米用 0.5% NaCl 水溶液十倍稀释, 分别取 100 μ L (50 mg 湿重) 悬浮液涂布 LB 平板及 2216E 海水平板 (蛋白胨 5 g 酵母粉 1 g 磷酸铁 0.1 g 陈海水 1000 mL) 在 4 $^{\circ}$ C 培养 7—30 d 后平板计数, 采用菌落数范围在 30—300 CFU 平板的平板进行统计, 计算出每克沉积物中的可培养细菌总数。细菌总生物量的测定在以往研究中已经完成^[8]。用软件 SPSS 10 对可培养细菌数与总磷含量进行 Pearson 相关性分析。

2 结果与分析

2.1 南极湖泊沉积物中细菌的 16S rDNA 序列分析

根据菌落大小、形态、颜色等特征, 挑取分离平板上的单菌落进行四分体划线纯化, 最终从南极阿德雷岛淡水湖 PVC 沉积物中得到 34 株菌。从各层次样品分离效果看 (图 1), 表层 1—10 cm 多样性比较高, 最多可以达到 8 个属。分离的细菌测定其 16S rRNA 基

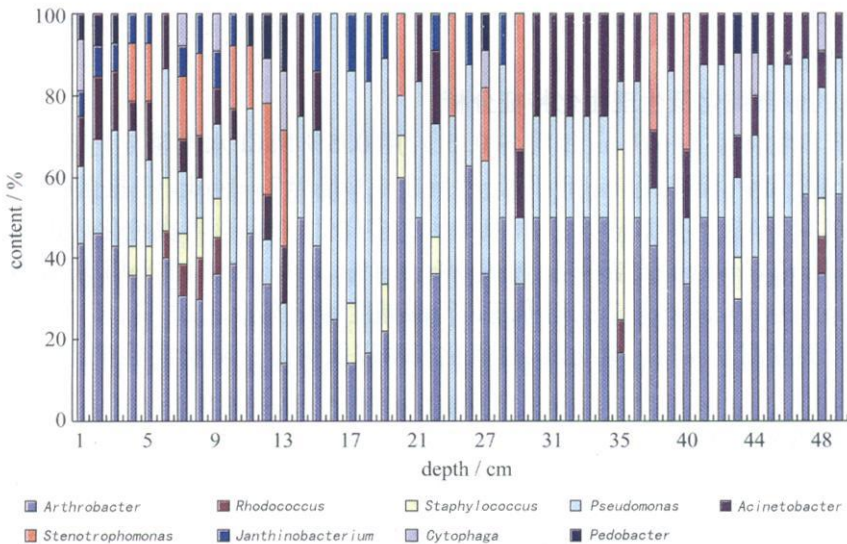


图 1 Y2-4 柱状样品中可培养细菌种类分布
Fig 1 Distribution of culturable bacteria in Y2-4 core

因序列并进行系统发育分析, 这 34 株细菌分属于革兰氏阳性菌: 节杆菌 (Arthrobacter 11 株)、红球菌 (Rhodococcus, 2 株)、葡萄球菌 (Staphylococcus, 4 株)、gamma 变形细菌 (gamma proteobacteria)、假单胞菌 (Pseudomonas 8 株)、不动杆菌 (Acinetobacter 3 株)、寡养单

的菌株能产生酯酶, 18%的菌能够水解明胶或者产生卵磷脂酶, 还有部分菌株具有产生几丁质酶、琼脂酶或 β 半乳糖苷酶的能力。分离菌株的产酶能力存在类群的差异, γ 变形细菌中的多数菌株能同时产生 2—4 种酶类; 革兰氏阳性菌及拟杆菌门产酶能力一般。产生大分子物质水解酶的菌也具有类群的差别, 产脂肪酶 (Tween80) 的菌最多, 分布于节杆菌 (*Arthrobacter*)、假单胞 (*Pseudomonas*)、不动杆菌 (*Acinetobacter*)、寡养单胞菌 (*Stenotrophomonas*)、紫色杆菌 (*Janthinobacterium*) 和假结核棒杆菌 (*Cytophaga*) 6 个属; 其他酶产生菌分别属于 2—3 个属 (表 1)。

2.3 异养细菌计数

以往用分子生物学方法表明该位点细菌总量在 $10^7 - 10^8$ copy/克土壤, 且各层次分布均匀^[8], 本研究对沉积柱状样 Y2-4 的 1—49 cm 中以 LB 培养基进行的可培养细菌生物量统计, 含量从 $0 - 10^3$ CFU/克土壤, 仅达到细菌总量的万分之一, 但是其在每层次中的分布不均匀, 有比较大的起伏, 将其变化趋势与总磷含量比较 (图 3) 相关性分析表明两者的相关系数为 0.304 ($P < 0.05$, $n = 49$), 说明两者有较明显的相关性。以 2216E 海水培养基进行的可培养细菌生物量统计结果每层次分布与 LB 培养基基本一致, 但是数量低于 LB 培养基的统计数据 (具体结果未列出)。

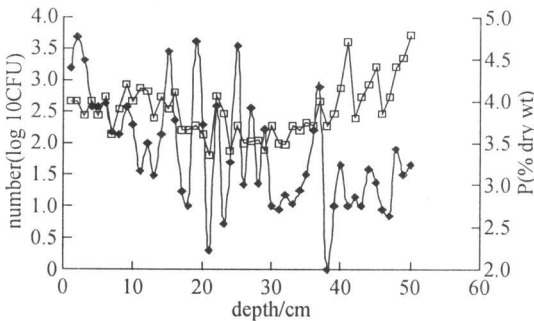


图 3 Y2-4 柱状样品中可培养细菌总量与总磷含量关系。◆: 可培养细菌总量, □: 代表总磷含量
Fig 3 Phosphorous concentrations and number of culturable bacteria in Y2-4 core □— Phosphorous concentrations ◆— the number of culturable bacteria

3 讨论

南极无冰区是伴随着气候变暖和冰盖退缩而产生的, 因此, 无冰区的演化记录着南极地区历史时期的气候环境演变过程。微生物在这个相对简单的生态系统中扮演重要的角色, 敏锐地反应整个南极生态系统的变化。以往分子生物学调查表明 Y2 湖沉积物细菌包括变形杆菌、拟杆菌、厚壁菌、放线菌等多种类群^[8], 在本研究中可培养细菌多样性低于分子生物学调查结果, 其中节杆菌属为绝对优势菌, 节杆菌分布广泛包括土壤、海洋、临

床等环境,大部分是嗜温菌,绝对好氧^[11];本研究中所分离的节杆菌多数是兼性厌氧菌,耐冷菌,从表层有氧环境到底部厌氧环境都有分布,其中 A124、A125 是新种^[12],说明该菌属的适应性非常广泛。另一个优势菌为假单胞菌,假单胞菌自然界分布极广,在自然界物质转化中作用广泛且重要,能利用多种有机物,包括一些较复杂的不易为其他微生物利用的化合物^[11],本研究所分离到的假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 菌株大部分可以在低温下产生大分子水解酶,属于细菌对南极常年冷冻环境适应性的一种表现。该研究所分离的菌株中革兰氏阳性细菌占了很大一部分,革兰氏阳性细菌壁厚,抗逆性比较好,这也与南极独特的干燥、酷寒、强辐射的自然环境相一致。Y₂湖是小型淡水湖,但是以往研究中铍和钡的浓度比值显示出海洋沉积的特征,本研究中所分离得到的菌株在 3.4‰ NaCl 条件下生长状态良好,从生物学角度为 Y₂湖的海洋沉积特征提供了支持。

湖泊沉积物中保存完好的生物遗迹(企鹅粪土)被成功地用于探讨企鹅数量记录及其与环境气候的演变、人类活动之间的关系^[13-14],研究表明南极含企鹅粪的沉积剖面是理想的过往生态环境信息载体。阿德雷岛为企鹅聚居地,淡水湖 Y₂沉积物有保存较好的企鹅粪,孙立广等研究表明包括磷在内的 9 种元素在该区浓度随深度的变化表现出高度的协同性,是企鹅粪土沉积的标型特征^[15]。以往分子生物学方法调查表明细菌总量在沉积柱状样品 Y₂-4 中分布均匀, 10^7-10^8 copy/克土壤,与化学元素结果相关性不大^[8]。本研究采用 LB 淡水培养基和 2216E 海水培养基对可培养细菌总量进行了统计,两种统计结果均表明 Y₂湖可培养细菌的总量随着深度变化与企鹅粪土标型特征元素总磷含量有较高相关性,说明该区可培养细菌分布受到企鹅排泄物的影响。肖湘等曾在 2005 年通过分析沉积物中的几丁质酶产生菌数量类型,发现企鹅排泄物可以影响几丁质降解菌的群落结构^[5]。结合以往该区 3000 年来企鹅数量的变化并与环境变化相联系,研究结果^[13]表明,阿德雷岛淡水湖细菌群落结构变化与 1600 年来的气候环境变化有密切关系。可见可培养细菌的多样性及数量的变化都比较好地反应了环境特征,这可能因为培养获得的微生物往往代表了样品中数量最多,生理功能最活跃的类群,同时也是环境微生物群落中最能反映生态环境特征的类群^[7]。因此虽然传统的人工培养方法受到培养基成分和培养条件等方面的限制而无法较全面地反映环境中的微生物多样性,但是对环境样品中的细菌进行培养,可以较准确地了解样品中生理功能活跃的细菌类群,对分子生物学方法的研究结果是一个良好的补充。

参考文献

- 1 李会荣,孙嘉康,陈丽珊,等. 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): 245-253.
- 2 Bano N, Ruffin S, Ranson B, et al. Phylogenetic composition of Arctic Ocean Archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages. APPL Environ Microbiol. 2004 70 (2): 782-789.
- 3 Stuckbrandt E, Brambilla E, Cousin S, et al. Culture independent analysis of bacterial species from an anaerobic mat

- from Lake Fryxell Antarctica: Phylogenetic diversity revisited. *Cell Mol Biol* 2004, 50: 517–524
- 4 Moosvi S A, McDonald IR, Pearce D A, et al. Molecular detection and isolation from Antarctica of methylophilic bacteria able to grow with methylated sulfur compounds. *Syst Appl Microbiol* 2005, 28: 541–554.
- 5 Xiao X, Yin X, Lin J, et al. Chitinase genes in lake sediments of Ardley Island, Antarctica. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71(12): 7904–7909
- 6 张锐, 林念炜, 赵晶, 等. 南极阿德雷岛地表沉积物中细菌多样性及其对环境的相应. *自然科学进展*, 2003, 13(10): 1067–1072
- 7 Sait M, Hugenholz P, Janssen PH. Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineages previously only detected in cultivation independent studies. *Environ Microbiol* 2002, 4(11): 654–666.
- 8 Li S, Xiao X, Yin X, et al. Bacterial community along a historic lake sediment core Ardley Island, west Antarctica. *Extremophiles* 2006, 10: 461–467.
- 9 Bowman J P. Methods for Psychrophilic Bacteria//Paul J. Marine Microbiology. San Diego: Acad Press, 2001, 30: 591–613.
- 10 DeLong E F. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci* 1992, 89: 5685–5689.
- 11 Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th Edition). USA: The Williams & Wilkins Company, 1994, 335–346.
- 12 Chen M, Xiao X, Wang P, et al. *Arthrobacter ardleyensis* sp. nov., isolated from Antarctic lake sediment and deep-sea sediment. *Arch Microbiol* 2005(183): 301–305.
- 13 黄涛, 孙立广, 吴自军, 等. 戴维斯站区与长城站区企鹅粪土层生物标型元素的确定与比较. *极地研究*, 2007, 19(4): 247–254.
- 14 Roberts D, McMinn A, Zwan ID. An initial palaeosalinity history of Jaw Lake, Bunge Hills based on a diatom salinity transfer function applied to sediment cores. *Antarctic Science* 2000, 12: 172–176.
- 15 Sun L G, Xie Z Q, Zhao J L, et al. A 3000 year record of penguin populations. *Nature* 2000(407): 858.

PHYLOGENETIC DIVERSITY OF CULTURABLE BACTERIA IN LAKE SEDIMENT OF ARDLEY ISLAND, ANTARCTIC

Wang Peng, Wang Fengping

¹ State Key Laboratory of Marine Geology, Tongji University, Shanghai 200092, China

² Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

Abstract

The phylogenetic diversity of culturable bacteria in lake sediment of the Ardley Island, Antarctica was investigated. A total of 34 strains were isolated and 16 S DNA nearly full length sequence analysis revealed that strains fall in 4 divisions: gram positive bacteria (*Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*), gamma proteobacteria (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*), beta proteobacteria (*Janthinobacterium*), Cytophaga Flexibacteria, Bacteroides (*Cytophaga*, *Pedobacter*). The majority of the bacterial strains are able to secrete diversity cold-adaptive hydrolytic enzymes in the medium at 4 °C. The isolates that are able to produce

lipase, gelatinase or lecithinase account for respectively 32%, 18%. The curable bacterial biomass showed significant correlation with phosphorus, indicating a historical connection between the culturable bacteria and the amount of penguin guano input into the lake sediment.

Key words Antarctic bacteria; cold-adaptive hydrolytic enzymes; penguin