

贵州兴义喀斯特洞穴土可培养细菌多样性及其产蛋白酶、淀粉酶活性筛选

张万芹^{1,5} 张永光² 房保柱³ 魏大巧⁴ 韩明贤^{4,5} 李帅^{3,5} 肖敏³ 李文均^{3,5*}

(1. 兴义民族师范学院生物与化学学院 贵州 兴义 562400)

(2. 中国科学院新疆生态与地理研究所 中国科学院干旱区生物地理与生物资源重点实验室 新疆 乌鲁木齐 830011)

(3. 中山大学生命科学学院 广东 广州 510275)

(4. 昆明理工大学医学院 云南 昆明 650500)

(5. 云南大学 云南省微生物研究所 云南 昆明 650091)

摘要:【目的】进一步了解贵州喀斯特洞穴土可培养细菌的物种多样性组成及其产蛋白酶、淀粉酶生物活性能力。【方法】选取 11 种分离培养基, 利用稀释直接涂布平板法对贵州黔西南兴义市喀斯特地区白碗窑镇魔家大溶洞洞内土壤进行可培养细菌分离; 利用两种鉴定培养基对相关细菌进行生物活性判定。【结果】根据 16S rRNA 基因序列的系统进化分析, 将分离得到的 217 株细菌分别归类到 24 个属的 63 个不同种类, 其中红球菌属(*Rhodococcus*)和链霉菌属(*Streptomyces*)为该洞内土壤可培养细菌的优势菌群, 分别占 24.42%和 21.66%。大多数菌株与已知典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 97.90%–99.99%, 其中至少有 4 株菌株(D3T01、D911、D961 和 D502)为潜在的新分类单元。对 217 株细菌进行蛋白酶和淀粉酶活性筛选, 其中具有蛋白酶或淀粉酶活性的 99 株, 占分离菌株的 45.62%, 分别属于 18 个属的 38 个不同种; 同时具有蛋白酶和淀粉酶活性的 36 株, 占具有酶活性菌株的 36.36%, 占分离菌株的 16.59%。【结论】贵州兴义喀斯特洞穴土中存在丰富多样的细菌类群, 且蕴藏着一定数量的潜在新物种资源; 此外功能酶菌株在喀斯特洞穴土壤中大量存在, 为工业应用奠定了资源基础, 极具进一步发掘和研究的价值。

关键词: 喀斯特洞穴, 细菌多样性, 蛋白酶, 淀粉酶

Foundation item: Guangdong Province Higher Vocational Colleges & Schools Pearl River Scholar Funded Scheme (2014)

***Corresponding author:** Tel/Fax: 86-20-84111727; E-mail: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn; liact@hotmail.com

Received: November 10, 2015; **Accepted:** January 19, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 25, 2016
基金项目: 广东省高等学校珠江学者岗位计划项目(2014)

***通讯作者:** Tel/Fax: 86-20-84111727; E-mail: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn; liact@hotmail.com

收稿日期: 2015-11-10; **接受日期:** 2016-01-19; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-03-25

Studies on diversity of culturable bacteria in karst cave soil of Xingyi, Guizhou and their protease and amylase activities

ZHANG Wan-Qin^{1,5} ZHANG Yong-Guang² FANG Bao-Zhu³ WEI Da-Qiao⁴
HAN Ming-Xian^{4,5} LI Shuai^{3,5} XIAO Min³ LI Wen-Jun^{3,5*}

(1. College of Biology and Chemistry, Xingyi Normal University for Nationalities, Xingyi, Guizhou 562400, China)

(2. Key Laboratory of Biogeography and Bioresource in Arid Land, Xinjiang Institute of Ecology and Geography Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

(3. School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China)

(4. Medical Faculty of Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650500, China)

(5. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

Abstract: [Objective] The main focus for the current study is to investigate the diversity of culturable bacteria in soils of karst caves located in Xingyi county of Guizhou province and to analyze their potential for production of protease and amylase. [Methods] Isolation of the culturable bacteria was done by spread plate technique using 11 synthetic media. Phylogenetic relationship of the isolates based on their 16S rRNA gene sequences was analyzed. The isolates were then screened for production of protease and amylase using plate method. [Results] Based on the 16S rRNA gene sequences, a total of 217 isolates affiliated to 63 species of 24 genera were determined, of which the genera *Rhodococcus* and *Streptomyces* were the dominant bacteria (comprising 24.42% and 21.66% respectively). Majority of these strains had 16S rRNA gene sequence similarities ranging between 97.90% and 99.99% with related type strains, except the strains D3T01, D911, D961 and D502 which are potential new taxa. Of these culturable bacteria isolated, 99 strains belonging to 38 species of 18 genera were positive for protease and/or amylase activities. Among these, 36 strains had both amylase and protease activities, thus constituting about 36.36% of the bioactive strains and 16.59% of the total isolates. [Conclusion] The results indicated that soil of karst caves in southwest of Guizhou are promising sources for isolation of many bioactive strains, with potential for further exploration and research.

Keywords: Karst cave, Biodiversity, Protease, Amylase

洞穴为典型地下喀斯特地貌，以其不连续的生境、完全的黑暗、几乎恒定的空气和水温、接近饱和的湿度以及极度贫乏的有机营养来源为特征。洞穴被认为是一种陆地黑暗生态系统的极端环境^[1]。中国以广西、云南和贵州等省(区)成为著名的喀斯特地貌区域，也是喀斯特洞穴资源最丰富的国家^[2-3]，而贵州黔西南喀斯特地貌以其分布了大量溶洞而成为贵州省重要土壤贫瘠地。贫瘠的有机营养和能量使得洞穴中的微生物主要以化能无机自养为主，同时，受物理条件制约，洞穴系统能够几千年甚至几十万年的保持不变，能够对微生物群落进行有效的长期保存，使得喀斯特洞穴环境中微生物资源及其多样性的研究有着重大而深远的意义。

早在 20 世纪初，美国、加拿大、澳大利亚、英国、俄罗斯以及法国等国的微生物学者、地质学家、化学家开始对洞穴中的微生物及其在洞穴中次生矿物形成过程中的作用和机理进行了不同层面的深入研究。而现今国内外学者对洞穴微生物研究也主要集中于碳酸盐沉积和溶解，地质微生物学和生物地球化学中微生物对金属和养分循环作用，如铁锰的沉积，碳、氮和硫等元素的循环等^[4-24]。与其他国家相比，国内对洞穴微生物的研究还在起步阶段，并且研究领域较有限。另外，有关微生物的应用报道主要集中在代谢产物制剂，如抗菌素、表面活性剂及酶制剂等方面^[25-28]。

目前，国内有关喀斯特洞穴微生物群落组成研究还鲜有报道，尽管对喀斯特微生物代谢产物

的研究已经起步,但与其它环境相比研究尚少,使得这一方向的研究前景广阔,同时对促进喀斯特地域的生态学与地质微生物学研究的发展有重大作用。本研究旨在了解贵州黔西南喀斯特洞穴中细菌的多样性组成及其产蛋白酶、淀粉酶活性菌株情况,为促进对洞穴和喀斯特生态学与地质微生物学研究奠定一定的基础,同时为开展微生物资源的研究与开发利用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料:于2014年11月通过三角采样法取贵州省黔西南州兴义市白碗窑镇魔家大溶洞洞内土壤3份,于4℃保存备用。

1.1.2 主要试剂和仪器:细菌通用引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;DNA聚合酶、制霉菌素等购自于上海生工生物工程有限公司。PCR仪、电泳仪,Bio-Rad公司;凝胶成像仪,GEL Logic200 Imaging System。

1.1.3 分离培养基:每种分离培养基加制霉菌素50 mg/L。

(1) CC培养基(g/L):微结晶纤维素1.0,酪蛋白水解物1.0,硝酸钾0.2,磷酸氢二钠0.5,七水硫酸镁0.05,七水硫酸亚铁0.01,琼脂11.0,pH 7.5。

(2) HP培养基(g/L):海藻糖1.0,脯氨酸0.5,硝酸钾0.5,磷酸氢二钠0.3,七水硫酸镁0.05,七水硫酸亚铁0.01,琼脂11.0,pH 7.5。

(3) ISP 5培养基^[29]。

(4) SC培养基(g/L):可溶性淀粉1.0,酪蛋白0.3,硝酸钾2.0,氯化钠2.0,七水硫酸镁0.05,磷酸氢二钾2.0,七水硫酸亚铁0.01,琼脂11.0,pH 7.5。

(5) LB培养基(g/L):氯化钠10.0,酵母提取物5.0,蛋白胨10.0,pH 7.2。

(6) 高氏培养基(g/L):可溶性淀粉20.0,氯化钠0.5,七水硫酸亚铁0.02,七水硫酸镁0.5,硝酸钾2.0,磷酸氢二钾1.0,pH 7.0。

(7) Cl-Na-HCO₃型培养基(g/L):氯化钠0.6,

碳酸氢钠0.2,七水硫酸镁0.01,氯化钾0.1,硼酸0.04,氯化铁0.01,微量盐10.0 mL,酵母膏1.0,胰蛋白胨1.0,琼脂20.0,pH 7.5。

(8) AV琼脂培养基(g/L):甘油5.0,精氨酸0.5,葡萄糖1.0,磷酸氢二钾0.3,七水硫酸镁0.2,氯化钠0.3,复合维生素1.0 mL,琼脂20.0,pH 7.5。

(9) T₅培养基(g/L):葡萄糖1.0,藕粉1.0,酵母提取物2.0,胰蛋白胨0.5,微量盐1.0 mL,碳酸钙0.5,琼脂20.0,pH 7.5。

(10) ISP 2培养基^[29]。

(11) R₂A培养基^[30]。

1.1.4 蛋白酶筛选培养基(g/L):脱脂牛奶50.0,琼脂12.0,pH 7.2-7.4。

1.1.5 淀粉酶筛选培养基(g/L):可溶性淀粉10.0,磷酸氢二钾0.3,碳酸镁1.0,氯化钠0.5,硝酸钾1.0,琼脂12.0,pH 7.2-7.4。

微量元素溶液成分(g/L):七水硫酸亚铁2.0,二水氯化锰1.0,七水硫酸锌1.0。

复合维生素成分(mg/L):维生素B₁1.0,维生素B₆1.0,维生素B₂1.0,苯丙氨酸1.0,烟酸1.0,生物素1.0,丙氨酸1.0。

1.2 方法

1.2.1 样品预处理:无菌条件下称取2.0 g新鲜土壤样品于装有200 mL无菌水(含8粒玻璃珠)的三角瓶中,30℃、170 r/min振荡1 h,无菌条件下用无菌水稀释至10⁻³。

1.2.2 细菌的分离纯化:取200 μL经预处理后的样品涂布于11种分离培养基上,每种培养基做2个平行,28℃培养14 d。记录每个分离培养基中的菌落数,根据菌株菌落的质地、基内菌丝和气生菌丝的形态和颜色、边缘凹凸、是否产生可溶性色素及其颜色,以及显微镜观察下的气生菌丝、基内菌丝和孢子形态特征,对每个分离培养基上生长的菌落进行分类,并将每个分离培养基不同类群单菌落挑取2-3个在R₂A琼脂培养基上培养7 d,再将单菌落转接到新的无菌R₂A培养基的培养皿中,

28 °C 培养 7–14 d 获得纯化菌落。

1.2.3 细菌的分子生物学鉴定: (1) DNA 的提取: 采用酶小量法提取^[31]。(2) PCR 扩增 16S rRNA 基因: 采用细菌通用引物(PA: 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3', 对应于 *Escherichia coli* 的 7–24; PB: 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3', 对应于 *E. coli* 的 1 540–1 522)进行 16S rRNA 基因扩增, 50 μ L 反应体系: ddH₂O 37.7 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, dNTPs (10.0 mmol/L) 4 μ L, PA (10 μ mol/L) 1 μ L, PB (10 μ mol/L) 1 μ L, *Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.3 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L。PCR 扩增反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 32 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用经 EB 染色的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 送上海生工生物工程有限公司测序。(3) 16S rRNA 基因序列的系统发育分析: 将单向测序返回的 16S rRNA 基因序列选取 650 bp 左右序列, 利用 EzBioCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 网站进行相似性比对分析; 选取同源性较高的典型菌株(相似性在 97.90% 以上)的 16S rRNA 基因序列作为参比对象, 利用软件 ClustalW 2.0^[32]和 MEGA 5.1^[33]进行聚类分析, 通过邻接法(Neighbor-Joining)^[34]构建系统进化树。用于检验支持率的重复抽样次数为 1 000 次。

1.2.4 细菌酶学活性的筛选: 产蛋白酶、淀粉酶菌株的筛选: 在蛋白酶、淀粉酶筛选培养基上接种菌株, 各菌株的接种量尽可能一致, 接种好的平板在 28 °C 条件下培养 7 d。蛋白酶筛选直接观察, 菌落周围有透明圈的为阳性。淀粉酶筛选的用 0.1% 的碘液染色, 在 5 min 之内观察结果, 菌落周围有透明圈的为阳性。

活性记录方法: 活性圈半径 R –菌落半径 r 。

活性大小分布: $0 \text{ cm} < R-r \leq 0.5 \text{ cm}$, $0.5 \text{ cm} < R-r \leq 1.0 \text{ cm}$, $1.5 \text{ cm} < R-r \leq 1.5 \text{ cm}$, $1.5 \text{ cm} < R-r \leq 3.0 \text{ cm}$, 后 3 种范围为较高活性范围。

2 结果与分析

2.1 相同条件下各培养基的分离效果

将经过预处理的样品在 11 种培养基上 28 °C 培

养 14 d, 根据菌落大小、形态、颜色初步判断其类群, 通过计算单位面积菌落数量等不同特征, 判断不同培养基分离细菌的多样性, 结果见表 1。

从兴义魔家大洞洞内土壤细菌分离结果看出, (8) AV 琼脂培养基和(11) R₂A 培养基分离效果最好, 无论是在分离的菌落个数、各类群组成以及菌落长势上都较其它培养基占优势。

2.2 兴义魔家大洞洞内土壤可培养细菌多样性

从魔家大洞洞内土壤中分离出 217 株细菌, 经 16S rRNA 基因测序, 217 株细菌分别属于土壤球菌属(*Agrococcus*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、节细菌属(*Arthrobacter*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)、糖霉菌属(*Glycomyces*)、白蚁菌属(*Isopterocola*)、马西亚菌属(*Massilia*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardopsis*)、厄氏菌属(*Oerskovia*)、类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)、原小单胞菌属(*Promicromonospora*)、假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、鞘氨醇单胞菌

表 1 不同培养基分离效果
Table 1 The separation effect of different culture media

培养基 Medium	菌落数(个) Clones	类群(个) Groups	菌落长势 Growth
(1)	53	5	+
(2)	57	5	+
(3)	107	9	+++
(4)	103	7	+++
(5)	71	7	++
(6)	69	7	++
(7)	74	8	++
(8)	123	16	++++
(9)	111	10	+++
(10)	109	5	+++
(11)	127	18	++++

注: ++++: 菌落长势好; +++: 菌落长势较好; ++: 菌落长势一般; +: 菌落长势不好。

Note: ++++: Very good growth; +++: Good growth; ++: Moderate growth; +: Weak growth.

属(*Sphingomonas*)、新鞘氨醇属(*Sphingopyxis*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)。结果见表 2。

从所分离菌株的种类多样性分析, 兴义魔家大洞洞内土壤中分离出 217 株细菌分别属于 24 个属中 63 个种, 其中微杆菌属(*Microbacterium*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、红球菌属(*Rhodococcus*)以及链霉菌属(*Streptomyces*)在该洞内土中分布的种类较多, 分别占所分离菌株种数的 7.94%、7.94%、14.29%、14.29%; 从可培养菌株数量分析, 该洞内土壤普遍生存着红球菌属(*Rhodococcus*)和链霉菌属(*Streptomyces*)的细菌, 分别占所分离可培养菌株的 24.42%和 21.66%。

2.3 可培养细菌系统进化分析

将所分离的细菌的 16S rRNA 基因序列进行 BLAST 比对分析, 选取每个种类菌株最大相似性的典型菌株的 16S rRNA 基因序列, 利用软件 ClustalW 2.0 和 MEGA 5.1 进行聚类分析, 构建的系统进化树(图 1)。

如图 1 所示, 24 个属中的细菌, 壤霉菌属(*Agromyces*)、土壤球菌属(*Agrococcus*)、微杆菌属(*Microbacterium*)间亲缘关系较近; 同样, 白蚁菌属(*Isoptericola*)、厄氏菌属(*Oerskovia*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*), 微球菌属(*Micrococcus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*), 红球菌属(*Rhodococcus*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*), 寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、芽胞杆菌属(*Bacillus*)、

表 2 各属别种类菌株数及所占比例分布情况
Table 2 The distribution of the genera and strains

属别 Genus name	种数(个) Species	占分离种类数比例 Ratio of all species (%)	菌株数(株) Strains	占所分离菌株比例 Ratio of all strains (%)
土壤球菌属 <i>Agrococcus</i>	1	1.59	2	0.92
壤霉菌属 <i>Agromyces</i>	3	4.76	8	3.69
节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	3	4.76	4	1.84
芽胞杆菌属 <i>Bacillus</i>	5	7.94	11	5.07
短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i>	1	1.59	1	0.46
德沃斯氏菌属 <i>Devosia</i>	1	1.59	1	0.46
糖霉菌属 <i>Glycomyces</i>	1	1.59	1	0.46
白蚁菌属 <i>Isoptericola</i>	3	4.76	7	3.23
马西亚菌属 <i>Massilia</i>	1	1.59	1	0.46
微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	5	7.94	26	11.98
微球菌属 <i>Micrococcus</i>	1	1.59	3	1.38
诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i>	5	7.94	20	9.22
拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>	2	3.17	5	2.30
厄氏菌属 <i>Oerskovia</i>	1	1.59	1	0.46
类芽胞杆菌 <i>Paenibacillus</i>	1	1.59	1	0.46
原小单孢菌 <i>Promicromonospora</i>	4	6.35	16	7.37
假黄色单胞菌属 <i>Pseudoxanthomonas</i>	1	1.59	1	0.46
红球菌属 <i>Rhodococcus</i>	9	14.29	53	24.42
鞘氨醇杆菌属 <i>Sphingobacterium</i>	1	1.59	2	0.92
鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	2	3.17	2	0.92
新鞘氨醇属 <i>Sphingopyxis</i>	1	1.59	1	0.46
葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	1	1.59	2	0.92
寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	1	1.59	1	0.46
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	9	14.29	47	21.66

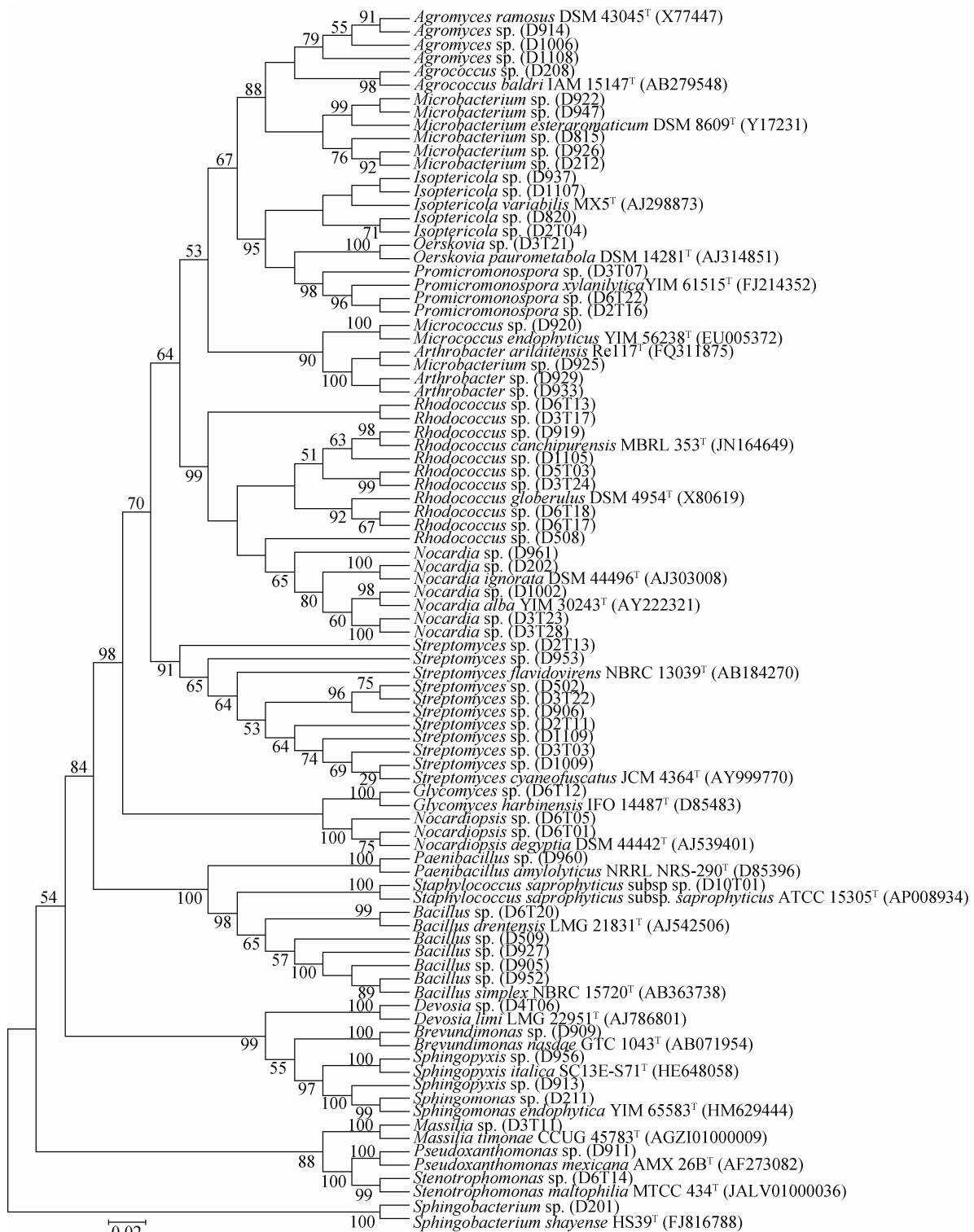


图 1 基于 16S rRNA 基因序列以邻位连接法构建兴义喀斯特洞内土壤可培养细菌之间的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree constructed by using the Neighbor-Joining method based on the 16S rRNA gene sequences of culturable microbial community in soil of Xingyi karst cave

注：计算结果大于 50% 的自举值显示在分支上，0.02 代表两个核苷酸之间的遗传距离。

Note: The bootstrap values > 50% are shown at branch points; Bar value 0.02: represents per nucleotide position.

类芽胞杆菌(*Paenibacillus*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、鞘新氨醇属(*Sphingopyxis*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、马西亚菌属(*Massilia*)、假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)分别聚类在同一支上,说明其亲缘关系较近。此外,也存在形成独立分支的,如糖霉属(*Glycomyces*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、链霉菌属(*Streptomyces*),说明洞穴可培养细菌物种存在多样性。另外,选取 16S rRNA 基因序列相似性较低的 D3T01 (97.88%)、D911 (98.01%)、D961 (97.84%)和 D502 (97.95%)通过克隆测序,获得 16S rRNA 基因序列与典型菌株序列相似性均小于 99%。

2.4 酶学活性的筛选

兴义魔家大洞洞内土壤中分离出的 217 株细菌,经过淀粉酶、蛋白酶活性筛选,共有 99 株有淀粉酶或蛋白酶活性。其中,具有酶学活性的部分菌株分布及其酶活性见表 3。

以 217 株分离于魔家大洞洞穴的土壤可培养菌种为出发菌株,筛选出 99 株具有淀粉酶或蛋白酶活性的菌株,占所分离菌株的 45.62%,分别属于 18 个属的 38 个不同种类,其与典型菌的相似性在 97.9%到 100%不等,部分菌株的酶活性如图 2 所示。其中,具有蛋白酶活性的菌株有 67 株,占具有酶活菌株的 67.68%,占所分离菌株的 30.88%;具有较高活性菌株 21 株,占具有酶活菌株的 21.21%,占所分离菌株的 9.68%。具有淀粉酶活性的菌株有 68 株,占具有酶活菌株的 68.69%,占所分离菌株的 31.34%,具有较高活性菌株 40 株($R-r > 0.5$ cm),占具有酶活菌株的 40.40%,占所分离菌株的 18.43%;既具有淀粉酶活性又具有蛋白酶活性的菌株有 36 株,占具有酶活性菌株的 36.36%,占所分离菌株的 16.59%,两者都具有的较高活性菌株有 2 株,为 D506 和 D3T11,分别属于链霉菌属(*Streptomyces*)和马西亚菌属(*Massilia*),其与典

型菌株的相似性分别为 100%和 99.62%。

3 讨论

目前,环境中 90%–99%的微生物至今仍无法通过经典的纯培养方式获得,为了研究和揭示环境中微生物在生物圈的生态功能、地理、地质地球化学等功能以及其代谢产物在抗菌素、酶制剂等方面的应用,必须获得其纯培养。因此,经典的分离纯化仍然是研究微生物功能和应用的一个关键手段。洞穴作为一种特殊的极端环境更是如此,本研究在实验室已有洞穴样品分离方法的基础上应用多种特殊分离培养基对喀斯特洞穴可培养细菌进行多样性观察,通过新的分离培养基的应用在一定程度上提高了洞穴样品可培养细菌的分离效果,但由于其环境样品的极端性,分离洞穴细菌的影响因素还有待进一步探索和研究。

与本实验室前期已对云南司岗里洞穴土壤样品中分离到的微生物类群相比,频率较高的微生物类群为诺卡氏菌属(*Nocardia*)和链霉菌属(*Streptomyces*),而本实验中所分离到的频率较高的诺卡氏菌属(*Nocardia*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)和红球菌属(*Rhodococcus*),从一定意义上认为诺卡氏菌属(*Nocardia*)和链霉菌属(*Streptomyces*)属于优势菌群,但由于地域性差异,可能会导致两次分离的主要类群出现轻微差异。与其它极端环境如高温、高盐及深海环境的优势菌群相比^[35-37],除在高温环境中有报道链霉菌属(*Streptomyces*)为优势菌群外,喀斯特洞穴中的优势菌群与其它环境均不同,说明喀斯特细菌具有独特的多样性,这些类群能够适应洞穴的封闭性,永久黑暗,贫营养等特点,说明有其独有的生理机能,这种生理机制也为我们研究和利用它的生态功能以及其代谢产物提供一定的研究方向,有待进一步研究。另外,从系统发育分析可以看出,尽管分离得到的洞穴菌株与最高相似性典型菌株的相似性相当一部分在 99%–100%之间,但是最高相似性菌株和所分离的菌株并不都聚在一个分支上。然而,要判

表 3 部分含酶活性的不同种类菌株
Table 3 Activities of enzymes for partial strains

分离菌株 Strains	蛋白酶活性圈 Protease activity circle (cm)	淀粉酶活性圈 Amylase activity circle (cm)	典型菌株 Closest type strain	相似性 Similarity (%)
D1006	0.60	—	<i>Agromyces cerinus</i> subsp. <i>nitratus</i> ATCC 51763 ^T	99.40
D1108	—	0.20	<i>Agromyces italicus</i> DSM 16388 ^T	99.06
D1016	0.90	—	<i>Arthrobacter arilaitensis</i> Re117 ^T	99.08
D929	0.20	0.60	<i>Arthrobacter bergerei</i> CIP 108036 ^T	98.70
D925	0.20	—	<i>Arthrobacter mysorens</i> LMG 16219 ^T	98.75
D509	0.50	—	<i>Bacillus idriensis</i> SMC 4352-2 ^T	99.66
D927	—	0.40	<i>Bacillus litoralis</i> SW-211 ^T	98.86
D804	0.50	—	<i>Bacillus simplex</i> NBRC 15720 ^T	100
D909	—	0.30	<i>Brevundimonas nasdae</i> GTC 1043 ^T	99.69
D6T12	—	0.40	<i>Glycomyces harbinensis</i> IFO 14487 ^(T)	98.20
D937	—	0.30	<i>Isophtericola hypogaeus</i> HKI 0342 ^T	99.52
D3T10	—	0.20	<i>Isophtericola variabilis</i> MX5 ^T	99.51
D3T11	0.70	0.90	<i>Massilia timonae</i> CCUG 45783 ^(T)	99.62
D1008	—	0.80	<i>Microbacterium esteraromaticum</i> DSM 8609 ^T	99.84
D212	0.50	—	<i>Microbacterium oxydans</i> DSM 20578 ^T	100
D818	0.60	—	<i>Microbacterium testaceum</i> DSM 20166 ^T	99.70
D3T27	—	0.50	<i>Micrococcus endophyticus</i> YIM 56238 ^T	100
D6T01	0.40	0.90	<i>Nocardiopsis aegyptia</i> DSM 44442 ^T	99.39
D6T05	0.50	0.40	<i>Nocardiopsis umidischolae</i> 66/93 ^T	99.23
D3T21	—	0.50	<i>Oerskovia paurometabola</i> DSM 14281 ^T	99.88
D960	—	1.30	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> NRRL NRS-290 ^T	100
D3T09	0.30	0.90	<i>Promicromonospora aerolata</i> V54A ^T	99.70
D1107	—	0.50	<i>Promicromonospora flava</i> CC 0387 ^T	99.69
D3T07	0.30	0.60	<i>Promicromonospora sukumoe</i> IFO 14650 ^T	100
D911	0.40	—	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> AMX 26B ^T	98.01
D508	0.10	0.20	<i>Rhodococcus defluvi</i> Ca11 ^T	98.71
D6T18	0.40	—	<i>Rhodococcus globerulus</i> DSM 4954 ^T	98.92
D1105	0.20	—	<i>Rhodococcus qingshengii</i> djl-6 ^T	99.38
D2T02	0.40	0.60	<i>Rhodococcus zopfii</i> DSM 44108 ^T	99.19
D6T14	1.10	—	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> MTCC 434 ^T	99.85
D506	0.60	0.90	<i>Streptomyces anulatus</i> NRRL B-2000 ^T	100
D1109	—	0.60	<i>Streptomyces canus</i> NRRL B-1989 ^T	100
D1137	—	0.60	<i>Streptomyces ciscaucasicus</i> NBRC 12872 ^T	100
D3T03	—	0.80	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> JCM 4364 ^T	100
D2T11	0.10	0.70	<i>Streptomyces endophyticus</i> YIM 65594 ^T	99.84
D502	0.20	1.30	<i>Streptomyces flavidovirens</i> NBRC 13039 ^T	97.95
D2T25	0.30	—	<i>Streptomyces qinglanensis</i> 172205 ^T	99.35
D3T22	0.20	1.10	<i>Streptomyces spiroverticillatus</i> NBRC 12821 ^T	98.89

注：—：没有活性。

Note: —: No activity.

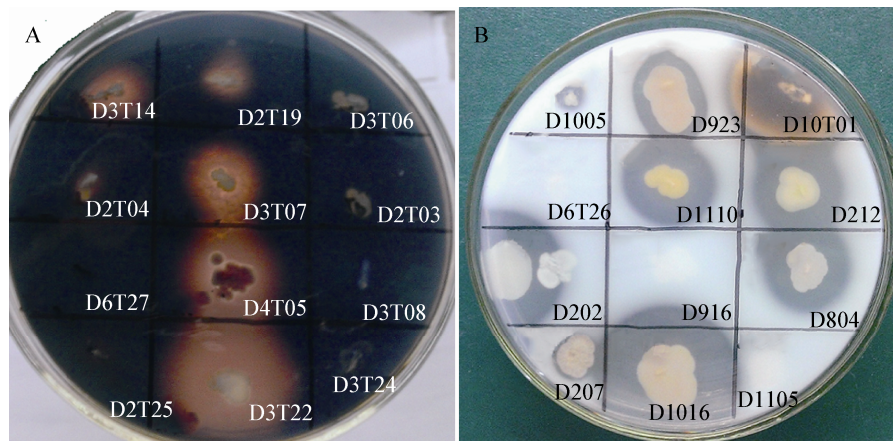


图 2 部分菌株酶学活性筛选图片

Figure 2 The pictures of some active strains

注: A: 部分菌株淀粉酶活性圈; B: 部分菌株蛋白酶活性圈.

Note: A: The amylase activity circle of partial strains; B: The protease activity circle of partial strains.

定其属于同一或不同种, 还需要考虑其生理、生化和分子杂交等特征与最高相似性菌株的关系。研究表明, 来自不同生境的微生物, 虽然其进化关系很近, 但是这些特殊生境微生物为了适应其特殊的生存环境, 已经进化出了某些适宜于环境的生理变化。目前普遍认为, DNA 杂交相似性<70%为“种”的界限^[38], 16S rRNA 基因序列相似性<95%, 且在系统进化树上形成稳定的独立分支, 又具有特征性碱基, 可以大体作为属的界限; 16S rRNA 基因序列相似性在 98.5%–99%的菌株仍然有可能属于不同的物种^[39]。因此, 本研究分离到的 217 株细菌, 最保守的计算是分别属于 24 个属中 63 个种, 可能其种数要远高于 63 个。其中, D3T01、D911、D961 和 D502 的 16S rRNA 基因序列相似性<99%, 至少这 4 株菌为潜在的新分类单元, 其中, D502 正在进行新分类单元的多相分类鉴定实验。

微生物代谢产物在抗菌素、酶制剂等方面已有大量发现, 洞穴作为陆地黑暗生态系统的极端环境, 生物可利用有机碳营养物质含量极低, 使得洞穴中微生物具有特殊的代谢机制。同时, 有研究指出, 洞穴中的独特动物多以其中的化能无机自养微生物作为初级生产者提供营养和能量^[40-41]。在深海热液口发现的以化能无机营养生物为基础的生态

系统已颠覆了所有生命都依赖于光的理论^[42]。实验室之前分离自云南司岗里洞穴土样中, 具有产淀粉酶、蛋白酶, 以及能同时产两种酶的菌株的比例分别为 60.1%、44.7%、38.6%, 分别归属于 18 个属, 其中链霉菌为产酶比例较高的类群。而本研究中共获得 99 株具有产生淀粉酶或蛋白酶能力的菌株, 分别属于 18 个属中的 38 个不同种(表 3), 具有产淀粉酶、蛋白酶, 及同时产两种酶的菌株的比例分别为 68.69%、67.68%、31.34%; 其中产蛋白酶和淀粉酶的菌株比例较高, 链霉菌同样为产酶比例较高的类群, 具有产酶能力的菌株在其它类群中也有一定的分布。研究结果表明, 洞穴微生物为了适应洞穴环境, 产淀粉酶或蛋白酶活性菌株在不同种类的细菌中广泛存在。这预示着洞穴微生物可能存在多样化的产酶机理和催化过程, 同时也显示着洞穴环境微生物所蕴藏的巨大应用前景和价值。因此, 本研究为新型酶制剂的探索研究奠定了一定理论基础。

参 考 文 献

- [1] Pedersen K. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspective[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 185(1): 9-16
- [2] Zhang YH, Zhu DH. Large karst caves distribution and development in China[J]. Journal of Guilin University of Technology, 2012, 32(1): 20-28 (in Chinese)
张远海, 朱德浩. 中国大型岩溶洞穴空间分布及演变规律[J]. 桂林理工大学学报, 2012, 32(1): 20-28
- [3] Li DT, Luo Y. Measurement of carbonate rocks distribution area in China[J]. Carsologica Sinica, 1983(2): 147-150 (in Chinese)

- 李大通, 罗雁. 中国碳酸盐岩分布面积测量[J]. 中国岩溶, 1983(2): 147-150
- [4] Laiz L, Groth I, Gonzalez I, et al. Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain)[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36(1/2): 129-138
- [5] Gerič B, Pipan T, Mulec J. Diversity of culturable bacteria and meiofauna in the epikarst of Škocjanske jame caves (Slovenia)[J]. Acta Carsologica, 2004, 33: 301-309
- [6] Hall AD, Miller NHJ. The effect of plant growth and of manures upon the retention of bases by the soil[J]. Proceedings of the Royal Society of London, Section B, 1905, 77(514): 1-32
- [7] Boquet E, Boronat A, Ramos-Cormenzana A. Production of calcite (calcium carbonate) crystals by soil bacteria is a general phenomenon[J]. Nature, 1973, 246(5434): 527-529
- [8] Léveillé RJ, Fyfe WS, Longstaffe FJ. Geomicrobiology of carbonate-silicate microbialites from Hawaiian basaltic Sea caves[J]. Chemical Geology, 2000, 169(3/4): 339-355
- [9] Boston PJ, Spilde MN, Northup DE, et al. Cave biosignature suites: microbes, minerals, and mars[J]. Astrobiology, 2001, 1(1): 25-55
- [10] Melim LA, Shinglman KM, Boston PJ, et al. Evidence for microbial involvement in pool finger precipitation, hidden cave, New Mexico[J]. Geomicrobiology Journal, 2001, 18(3): 311-329
- [11] Sanchez-Moral S, Canaveras JC, Laiz L, et al. Biomediated precipitation of calcium carbonate metastable phases in hypogean environments: a short review[J]. Geomicrobiology Journal, 2003, 20(5): 491-500
- [12] Barton HA, Northup DE. Geomicrobiology in cave environments: Past, current and future perspectives[J]. Journal of Cave and Karst Studies, 2007, 69(1): 163-178
- [13] Fliermans CB, Bohloul BB, Schmidt EL. Autecological study of the chemoautotroph *Nitrobacter* by immunofluorescence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1974, 27(1): 124-129
- [14] Thompson DB, Olson R. A preliminary survey of the protozoa and bacteria from Sulphur River in Parkers cave, Kentucky[J]. Bulletin of the National Speleological Society, 1988, 50: 42-46
- [15] Vlasceanu L, Popa R, Kinkle BK. Characterization of *Thiobacillus thioarvus* LV43 and its distribution in a chemoautotrophically based groundwater ecosystem[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3123-3127
- [16] Angert ER, Northup DE, Reysenbach AL, et al. Molecular phylogenetic analysis of a bacterial community in Sulphur River, Parker cave, Kentucky[J]. American Mineralogist, 1998, 83(11/12): 1583-1592
- [17] Engel AS, Porter ML, Kinkle BK, et al. Ecological assessment and geological significance of microbial communities from Cesspool cave, Virginia[J]. Geomicrobiology Journal, 2001, 18(3): 259-274
- [18] Engel AS, Lee N, Porter ML, et al. Filamentous "*Epsilonproteobacteria*" dominate microbial mats from sulfidic cave springs[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5503-5511
- [19] Barton H, Luiszer F. Microbial metabolic structure in a sulfidic cave hot spring: potential mechanisms of biospeleogenesis[J]. Journal of Cave and Karst Studies, 2005, 67(1): 28-38
- [20] Macalady JL, Lyon EH, Koffman B, et al. Dominant microbial populations in limestone-corroding stream biofilms, Frasassi cave system, Italy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(8): 5596-5609
- [21] Lawrence AR, Foster SSD. Denitrification in a limestone aquifer in relation to the security of low-nitrate groundwater supplies[J]. Journal of the Institution of Water Engineers and Scientists, 1986, 12(12): 159-172
- [22] Mattison RG, Abbiati M, Dando PR, et al. Chemoautotrophic microbial mats in submarine caves with hydrothermal sulphidic springs at Cape Palinuro, Italy[J]. Microbial Ecology, 1998, 35(1): 58-71
- [23] Engel AS, Stern LA, Bennett PC. Microbial contributions to cave formation: new insights into sulfuric acid speleogenesis[J]. Geology, 2004, 32(5): 369-372
- [24] Engel AS, Northup ED. Caves and Karst as model systems for advancing the microbial sciences[A]//Martin JB, White WW. Frontiers of Karst Research[M]. Leesburg: Karst Waters Institute Special Publication, 2008, 37-48
- [25] Gálvez A, Maqueda M, Martínez-Bueno M, et al. Isolation and physico-chemical characterization of an antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A12[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 39(4/5): 438-442
- [26] Herold K, Gollmick FA, Groth I, et al. Cervimycin A-D: A polyketide glycoside complex from a cave bacterium can defeat vancomycin resistance[J]. Chemistry A European Journal, 2005, 11(19): 5523-5530
- [27] Burg BVD. Extremophiles as a source of novel enzymes[J]. Current Opinion in Microbiology, 2003, 6(3): 213-218
- [28] Shaw TR. Historical introduction[A]//Hill CA, Forti P. Cave Minerals of the World[M]. Huntsville, AL: National Speleological Society, 1997: 27-43
- [29] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340
- [30] Reasoner DJ, Geldreich EE. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 49(1): 1-7
- [31] Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples[J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(1): 17-20
- [32] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882
- [33] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [34] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [35] Zhang J, He WH, Tang SK, et al. Diversity of culturable thermophilic actinobacteria and their producing cellulase activity in several dry-hot environments in Yunnan province[J]. Microbiology China, 2013, 40(6): 1109-1120 (in Chinese)
张敬, 何伟宏, 唐蜀昆, 等. 云南干热环境可培养高温放线菌多样性及产纤维素酶活性评价[J]. 微生物学通报, 2013, 40(6): 1109-1120
- [36] Feng W, Sun R, Gao GH, et al. Analysis of cultivable microbial community structure and affiliation in saline-alkaline soil in the Tuanbo Lake area of Tianjin, China[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(5): 1028-1035 (in Chinese)
冯伟, 孙瑞, 高广海, 等. 天津团泊湖地区盐碱土壤中可培养微生物群落结构和归属分析[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(5): 1028-1035
- [37] Zhao HY, Fang HX, Wang Y, et al. Diversity of bacteria isolated from marine sediment of Arctic and screening of strains with antifungal activity against plant pathogenic fungi[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(17): 149-153 (in Chinese)
赵惠娅, 方海霞, 王燕, 等. 北极海洋沉积物可培养细菌多样性及抗植物病原真菌活性菌株筛选[J]. 广东农业科学, 2012, 39(17): 149-153
- [38] Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1987, 37(4): 463-464
- [39] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards[J]. Microbiology Today, 2006, 33(4): 152-155
- [40] Chen Y, Wu LQ, Boden R, et al. Life without light: microbial diversity and evidence of sulfur- and ammonium-based chemolithotrophy in Movile cave[J]. International Society for Microbial Ecology, 2009, 3(9): 1093-1104
- [41] Porter ML, Engel AS, Kane TC, et al. Productivity-diversity relationships from chemolithoautotrophically based sulfidic Karst systems[J]. International Journal of Speleology, 2009, 38(1): 27-40
- [42] Jannasch HW. Review lecture: the chemosynthetic support of life and the microbial diversity at deep-sea hydrothermal vents[J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 1985, 225(1240): 277-297