

# 内陆土壤冷适应细菌的筛选分类与细胞膜脂肪酸的适冷机制

李博<sup>1</sup> MATTHIAS Dietrich<sup>1,2</sup> 李艳<sup>1</sup> 何冰芳<sup>1\*</sup>

(1. 南京工业大学生物与制药工程学院 江苏 南京 210009)  
(2. 斯图加特大学生物工程研究所 德国 斯图加特 70569)

**摘要:**嗜冷菌及耐冷菌是冷适应酶及生物活性物质的重要资源。本研究从内陆土壤筛得 33 株冷适应细菌, 包括 6 株革兰氏阳性菌与 27 株革兰氏阴性菌。通过细胞膜脂肪酸分析表明, 革兰氏阳性菌的膜脂肪酸主要为分支脂肪酸, 推测分支结构是阳性菌膜脂的主要适冷机制。革兰氏阴性菌呈现了不饱和、分支、短链等多样性的膜脂适冷调节方式。根据脂肪酸组分的多样性, 选择并鉴定了 17 株嗜冷及耐冷菌分布在 11 个属中, 细胞膜脂肪酸组成的变化规律与细菌 16S rRNA 的进化分布高度一致。研究还表明同为不饱和脂肪酸为主的革兰氏阴性菌呈现了不同的适冷机理。相关研究不仅阐述了冷适应细菌的细胞膜脂肪酸的适应机制, 而且为相关适冷酶源的开发利用提供了宝贵的资源。  
**关键词:**嗜冷菌, 耐冷菌, 脂肪酸组份, 适冷机制

## Isolation and Classification of Cold-adapted Microorganisms and Pattern of Membrane Fatty Acids in Cold-adaptation

LI Bo<sup>1</sup> MATTHIAS Dietrich<sup>1,2</sup> LI Yan<sup>1</sup> HE Bing-Fang<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China)  
(2. Institute of Technical Biochemistry, University of Stuttgart, Stuttgart 70569, Germany)

**Abstract:** Psychrophiles and Psychrotolerants are important resources of biologically active substances and cold-adapted enzymes. A total of 33 cold-adapted strains, including 6 Gram-positive strains and 27 Gram-negative strains, were isolated from soil samples. The analysis of these membrane fatty acids showed that the branched chain fatty acids were the major lipid pattern in Gram-positive bacteria, which may indicates their main cold adapted mechanism. However, the membrane fatty acids of Gram-negative bacteria were various, including unsaturated, branched and short-chain fatty acid. Species identifications were committed for 17 strains with typical fatty acid compositions. They were distributed in 11 genus. Variation of cell membrane lipid composition was consistent with the result of 16S rRNA. In addition, the Gram-negative bacteria exhibited the different strategies on cold adaptation, even that these strains mainly contained the unsaturated fatty acid. Related researches would not only represent cold adapted mechanism of cold-adapted microorganisms, but also provide the precious resources for the utilization of cold-adapted enzymes.

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA021306); 国家 973 计划项目(No. 2009CB724700)

\* 通讯作者: Tel: 86-25-83172069; Fax: 86-25-83172069; ✉: bingfangl@njut.edu.cn  
收稿日期: 2010-02-09; 接受日期: 2010-05-11

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

**Keywords:** Psychrophiles, Psychrotolerants, Fatty acid composition, Cold adapted mechanism

嗜冷菌在长期进化过程中形成了独特的适应机制及生理生化特性, 在基础研究和生物工程技术开发方面具有巨大的潜在价值。通用嗜冷菌(Psychrophiles)概念由 Morita 于 1975 年提出, 是指最适生长温度在 0–15°C 之间的微生物; 耐冷菌(Psychrotolerants)是指那些最适生长温度 > 15°C, 在 0–5°C 可生长繁殖的微生物<sup>[1]</sup>。嗜冷菌主要分布于南北两极、高山和深海等常冷的低温环境; 而耐冷菌分布广泛。目前开发较多的是深海中的嗜冷菌及耐冷菌; 内陆地区一些冷适应微生物资源的研究利用也备受关注。嗜冷菌及耐冷菌在冷适应酶、不饱和脂肪酸资源、食品加工及生物修复等方面均具有巨大的潜力<sup>[2]</sup>。

生物膜是磷脂双层的动态系统, 稳定适宜的流动性对生物膜维持其正常功能具有十分重要的作用, 如营养吸收、电子转移等<sup>[3]</sup>。在低温环境中, 微生物必须调节脂类的组成, 从而调节膜的流动性和相结构以适应环境温度的变化。尽管已有学者总结了一些适冷微生物的脂肪酸组成规律, 例如增加不饱和脂肪酸, 增加脂肪酸支链的比例<sup>[3]</sup>。但不同分类微生物在低温环境的长期进化过程中形成了系列的适冷机制和膜脂调控机制, 且耐冷菌较嗜冷菌而言生长温度宽泛, 可能具有更为多样而高效的调节方式。本研究从低温环境的土壤中分离出一批嗜冷菌及耐冷菌, 通过生物分类鉴定和细菌的脂肪酸分析, 阐述了不同属种嗜冷及耐冷菌膜脂适冷变化规律, 在一定程度上揭示了进化过程中不同种类适冷细菌相应的冷适应机制, 并为相关适冷酶的开发奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 土样及菌株来源

低温菌株分离自 2007 年 1–2 月间于东北及江苏各地采集的土样, 共 50 份。土样采集时气温约为 -5°C–10°C。

宿主 *E. coli* DH5 $\alpha$  用于 16S rRNA 基因克隆操作, 由本实验室保藏。

### 1.2 培养基

细菌筛选培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母粉

10.0, 氯化钠 10.0, 氯化镁 3.0, 硫酸钠 1.0, 磷酸氢二钾 1.0, 硝酸铵 1.0, 玉米浆 5 mL/L, pH 7.0。

LB 培养基(g/L): 酵母粉 5, 蛋白胨 10, NaCl 10, pH 7。

LB + Amp (氨苄青霉素)培养基: LB 培养基灭菌后加入已过滤除菌的氨苄青霉素储存液, 终浓度为 100 mg/L。

相应的固体培养基, 在上述成分上加 18 g/L 的琼脂。

### 1.3 嗜冷微生物的筛选

**1.3.1 富集培养:** 将采集的 4–5 份土样为一组, 每组中各份土样分别取约 0.2 g, 混合后装入 60 mL (/250 mL 烧瓶)细菌筛选培养基中培养。培养条件为 15°C, 180 r/min。根据菌生长情况, 培养 4 到 5 d 后转接 100  $\mu$ L 到新鲜液体培养基中培养。连续转接 3 次以富集适冷细菌。

**1.3.2 初筛与菌株分离:** 根据菌的生长情况选择合适的稀释倍数进行涂布。将富集培养液作梯度稀释。在 10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 两个稀释梯度中各取 100  $\mu$ L 涂布平板。涂布后的平板在 15°C 培养约 48 h, 观察平板菌落形态, 挑取不同形态的菌落分别进行划线分离。

对分离细菌进行革兰氏染色观察, 并配合 KOH 粘性试验<sup>[4]</sup>, 确定其革兰氏性质。

### 1.4 嗜冷细菌细胞膜脂肪酸组成的分析

**1.4.1 细胞脂肪酸样品处理:** 参照美国 MIDI 公司的微生物脂肪酸甲酯气相色谱鉴定方法<sup>[5]</sup>进行细胞脂肪酸甲酯衍生化。

**1.4.2 GC-MS 分析条件:** 脂肪酸甲酯(Fatty acid methyl esters, FAMES)用 GC-MS 联用仪(ThermoFinnigan TRACE DSQ)进行检测。

色谱条件: DB-5MS 毛细管柱(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m 膜厚, Agilent), 载气为高纯氦气(99.999%), 进样口温度 250°C, 起始柱温 100°C (0 min), 以 25°C/min 升温至 200°C (0 min), 然后以 10°C/min 升温至 300°C (0 min)。载气柱流速 1.0 mL/min, 恒流模式, 传输线温度 250°C。进样量 0.8  $\mu$ L。

质谱条件: 电离方式 EI, 电子能量 70 eV, 离子源温度 250°C, 扫描范围 50–400 amu<sup>[5]</sup>。

## 1.5 嗜冷细菌的 16S rRNA 序列分析与菌种鉴定<sup>[6]</sup>

## 2 结果

### 2.1 嗜冷及耐冷细菌的革兰氏染色分析与细胞脂肪酸组成分析

采用 15°C 的培养条件, 从土样中共筛得 33 株细菌, 其中革兰氏阳性菌 6 株, 革兰氏阴性菌 27 株。分析了所分离细菌细胞膜脂肪酸组成, 并根据饱和度和支链(图 1)及链长分布(图 2)等特征进行了总结。

由图 1 可见, 革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌膜的脂肪酸适冷机制有着显著的特点。革兰氏阳性菌的膜脂含有 85% 以上的支链饱和脂肪酸, 且碳链长度主要为 C15。表明利用分支脂肪酸来调整膜的流动性是所筛几个革兰氏阳性菌的主要适冷机制。而革兰氏阴性菌则呈现较为多样的适冷机制, 10% 以下革兰氏阴性细菌以支链饱和脂肪酸为主要膜脂调整方式。绝大多数阴性菌以不饱和和直链或不饱和和支链脂肪酸为主要形式存在, 表明这些革兰氏阴性菌主要以不饱和键的形式来调整膜脂在低温环境下

的流动性, 而分支脂肪酸也可作为革兰氏阴性菌膜脂冷适应机制的一个重要补充。由图 2 可见以分支脂肪酸为主的耐冷革兰氏阳性菌的膜脂碳链长度主要是 C15, 而以不饱和方式调节为主的阴性菌脂肪酸主要是 C16, C18 碳链。

### 2.2 嗜冷及耐冷细菌的 16S rRNA 鉴定

根据上述自行筛选的嗜冷及耐冷菌膜脂肪酸组成的多样性特征, 从中选择 17 株菌(在图 1, 图 2 以 \* 表示)以 16S rRNA 序列为分子指标进行菌种鉴定。运用 NCBI 网站的 BLASTn 程序与数据库中的细菌 16S rRNA 序列进行相似性分析。结果见表 1。

一般认为, 16S rRNA 序列同源性小于 98%, 属于不同的种; 同源性小于 93%–95%, 属于不同的属<sup>[7–8]</sup>。根据表 1 的结果, 因 B1-1 与基因库中已报道属的 16S rRNA 的同源性最高仅为 93% 左右, 推测为新属种; 其余 16 株细菌都能鉴定到属的水平, 除 B2-1、B2-6、B2-8、B2-9、B3-5 五株外, 剩余的 11 株均可鉴定到种。根据细胞膜脂组成的多样性选择的 17 株菌广泛分布于 11 个属, 还有一个推测新属种, 充分显示了土壤中嗜冷及耐冷菌的多样性。

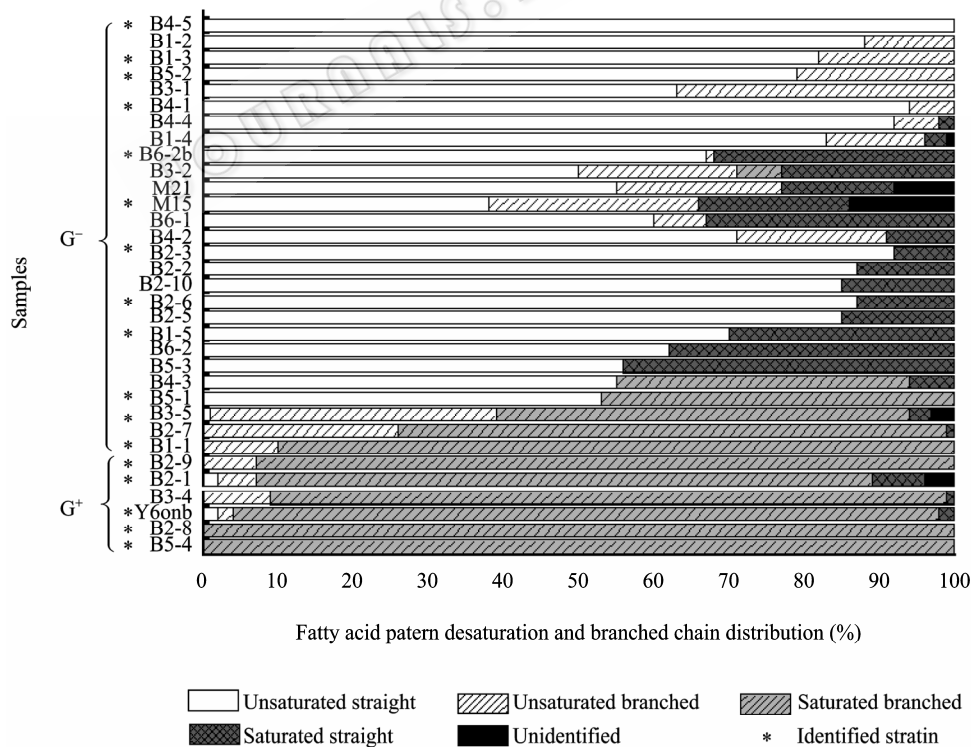


图 1 嗜冷细菌的脂肪酸组成(饱和度和支链)分布

Fig. 1 Desaturation and branched distribution of the fatty acid patterns of the isolated psychrophilic bacteria

注: 星号为 16S rRNA 测序菌株。

Note: The asterisks indicate the strains selected for 16S rRNA analysis afterwards.

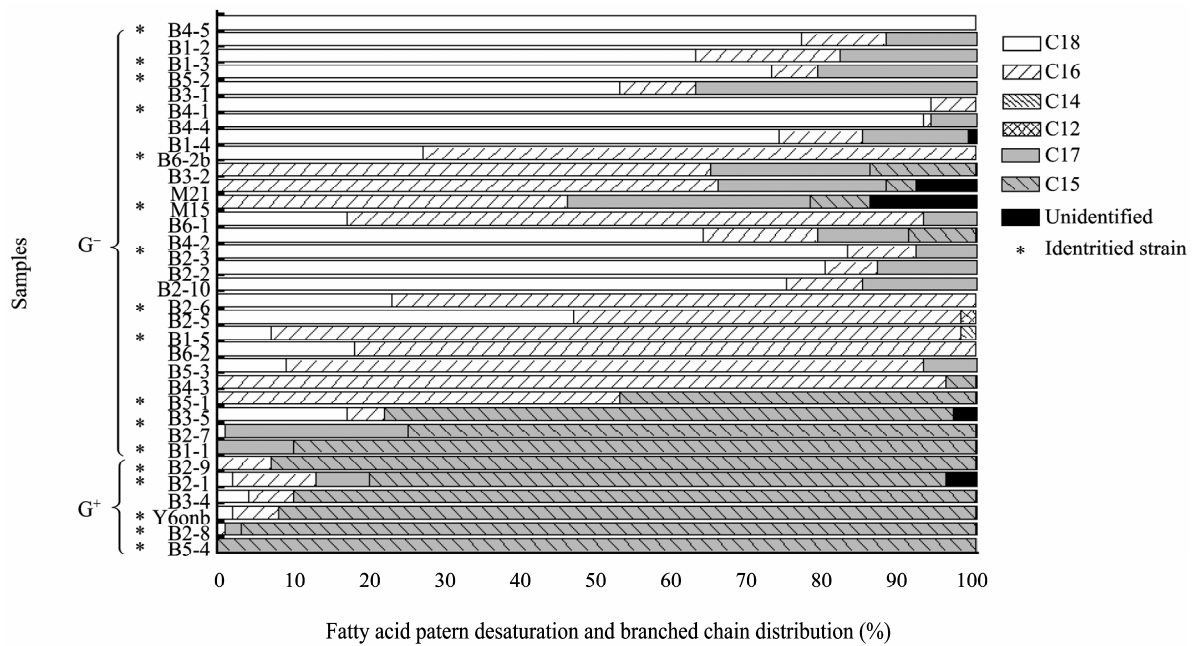


图 2 嗜冷细菌的脂肪酸组成(链长)分布

Fig. 2 Chain length distribution of the fatty acid patterns of the isolated psychrophilic bacteria

注: 星号为 16S rRNA 测序菌株.

Note: The asterisk indicate the strains selected for 16S rRNA analysis afterwards.

表 1 筛选嗜冷菌及耐冷菌的 16S rRNA 序列比对与分子鉴定		
Table 1 Results of 16S rRNA sequence alignment		
菌株	与已知菌的最大一致性(%)	
B1-1	<i>Myroides odoratimimus</i> YRR05	93.39
	<i>Flavobacterium</i> sp. DR2	92.94
B1-3	<i>Psychrobacter cibarius</i> JG-220	99.93
B1-5	<i>Acinetobacter johnsonii</i> S35	99.28
B2-3	<i>Psychrobacter pulmonis</i> KOPRI24933	99.93
	<i>Pseudomonas</i> sp. BBTR25	99.73
B2-6*	<i>Pseudomonas mendocina</i> PC7	95.48
	<i>Aequorivita</i> sp. ZS2-16 <i>Aequorivita</i> sp.	97.38
B3-5*	<i>Aequorivita antarctica</i> S4-8	95.93
B4-1	<i>Psychrobacter fozii</i> LMG 21280	99.53
B4-5	<i>Pseudochrobactrum asaccharolyticum</i> CCUG 46016	100
B5-1	<i>Sphingobacterium faecium</i> DSM 11690	99.46
B5-2	<i>Psychrobacter cibarius</i> JG-220	99.93
B6-2b	<i>Pseudomonas putida</i> GB-1	99.40
M15	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> TAC125	99.87
	<i>Planococcus</i> sp. Tibet-IX21	99.14
B2-1*	<i>Planococcus maritimus</i> KMM 3738	97.60
	<i>Arthrobacter</i> sp. ON14	99.47
B2-8*	<i>Arthrobacter stackebrandtii</i> CCM 2783	97.50
	<i>Leucobacter</i> sp. BBDP56	99.66
B2-9*	<i>Leucobacter chromiireducens</i> L-1T	98.09
B5-4	<i>Arthrobacter ardleyensis</i> An25	99.66
Y6onb	<i>Bacillus simplex</i> LMG 21002	99.67

注: \*: 与已知种的同源性 ≤ 98%, 鉴定到属.

Note: \*: The sequence revealed a homology below 98% to the known species, the strains were identified to genus level.

### 2.3 嗜冷及耐冷细菌系统发育树构建及对应脂肪酸冷适应规律分析

采用 ClustalX 1.83 和 MEGA 3.1 软件进行 16S rRNA 多序列比对和邻近连接(NJ)分析, 构建系统发育树(图 3)。

由图 3 可见以内陆土壤为主要来源的嗜冷及耐冷细菌的广泛分布, 5 株革兰氏阳性菌分布于 4 个属, 处于相同或邻近的进化分支上。而另外 11 株革兰氏阴性菌属于 7 个属, 常温菌 *Escherichia coli* T1 与耐冷菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* M15, 嗜热菌 *Pyrodictium occultum* PL-19、*Thermaerobacter subterraneus* mt-14 与耐冷菌 *Arthrobacter ardleyensis* B5-4 处于同一分支上, 表明嗜冷菌特别是耐冷菌与常温菌甚至是嗜热菌可能拥有共同的祖先, 但在不同环境中生存进化所致。另一方面也表明有些细菌可能是具有多样的适应机制能够在较宽的温度环境中生存。

以 16S rRNA 序列构建的进化树分布为依据来分析脂肪酸组成的变化趋势(分析见图 4)。5 株革兰氏阳性耐冷菌处于同一进化分支上, 分支饱和脂肪酸为主要膜脂组成。以分支脂肪酸为膜脂主要成分的 3 株阴性菌紧邻阳性菌形成单独的进化分支。大部分革兰氏阴性嗜冷及耐冷菌处于相同或邻近的进

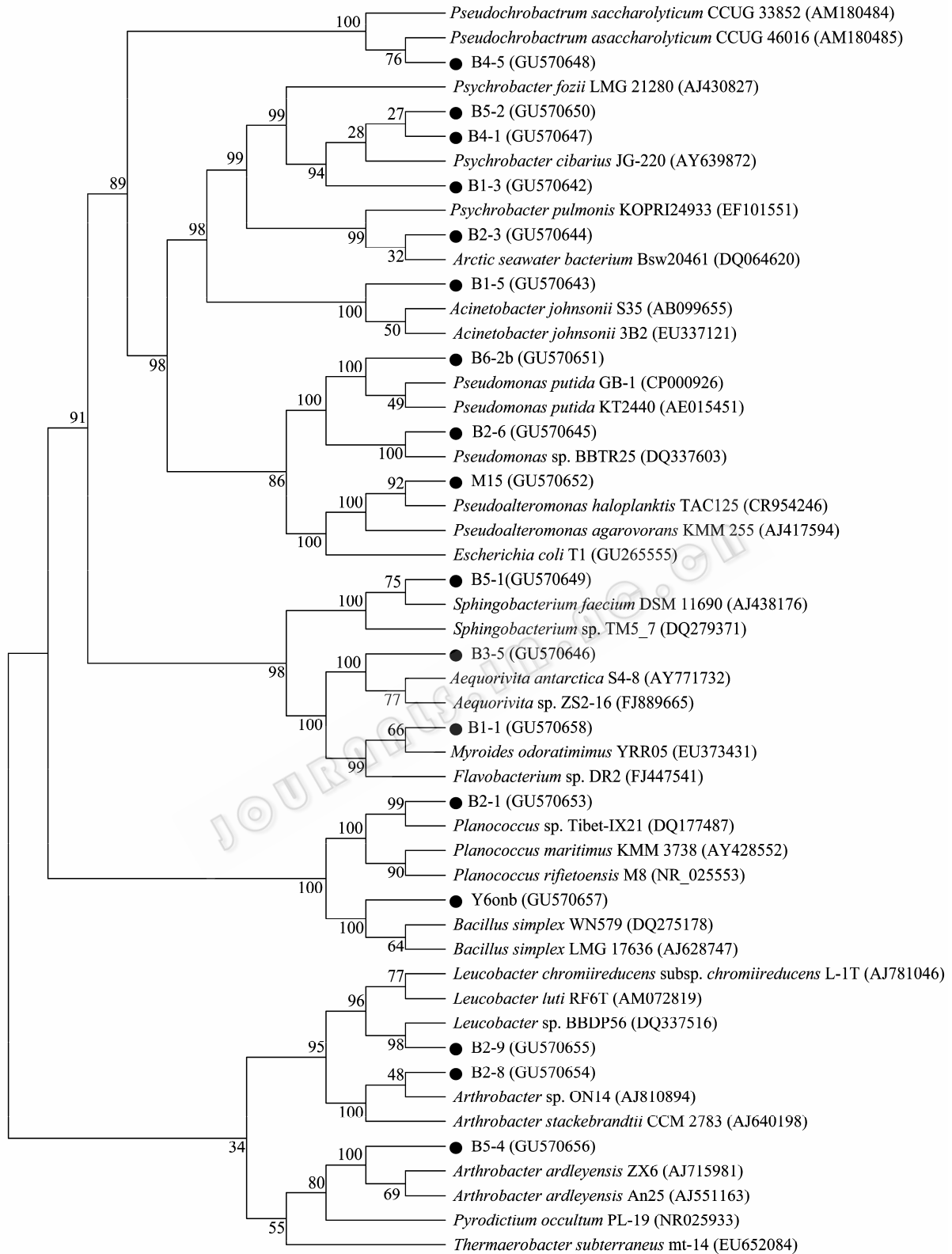


图 3 适冷细菌 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the homologies of 16S rRNA sequences in psychrophilic bacteria

注: 括号内为 GenBank 登录号; 分枝上的数字表示该树枝可信度的百分比。●: 16S rRNA 测序菌株。

Note: GenBank accession numbers are in the parenthesis. The figures on the branches indicate the reliabilities. ●: Strains for 16S rRNA sequencing.

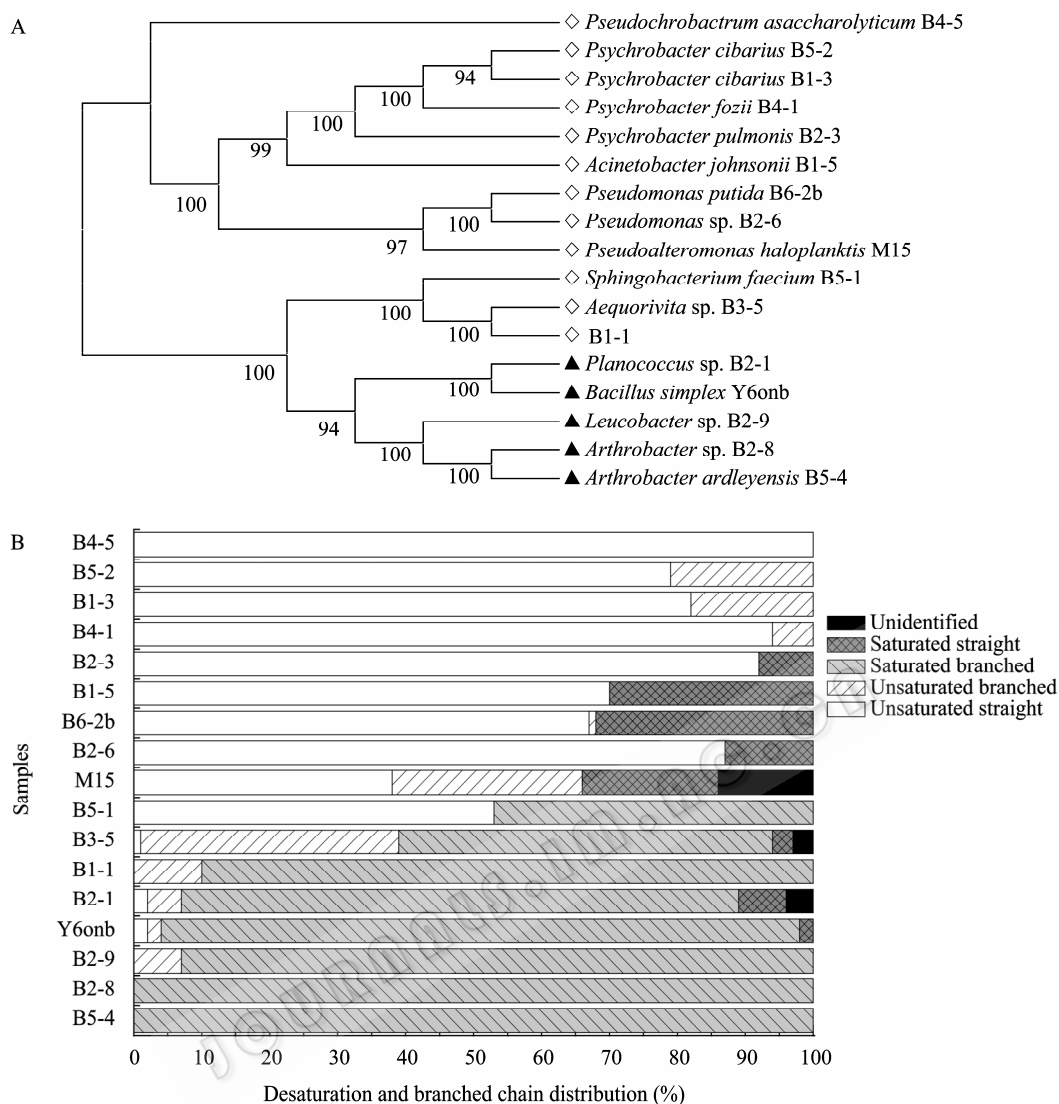


图 4 细胞脂肪酸组分特征与种属分布的关系

Fig. 4 Relationship between cellular fatty acid composition and species distribution

注: A: 已测菌株系统发育树(◇: 革兰氏阴性细菌; ▲: 革兰氏阳性细菌); B: 已测菌株脂肪酸不饱和及支链分布。

Note: A: Phylogenetic tree of the sequenced strains (◇: Gram negative bacteria; ▲: Gram positive bacteria); B: Desaturation and branched distribution of the fatty acid patterns of the sequenced strains.

化分支上, 呈现了以不饱和脂肪酸为主要膜脂组成, 表明所筛细菌的细胞膜脂肪酸组成的变化规律与细菌 16S rRNA 的遗传进化分布高度一致。

#### 2.4 生长温度对膜的脂肪酸组分影响

革兰氏阴性菌的适应机制呈现了多样性, 以 *Pseudomonas putida* B6-2b 和 *Psychrobacter cibarius* B5-2 为例, 两者均含有大量不饱和脂肪酸, 但两者的适冷机制却有较大差异(表 2)。

*Pseudomonas putida* B6-2b 中主要含直链脂肪酸(见图 4A), 其不饱和直链脂肪酸的含量随温度的降低而显著增高(见表 2)。30°C 时, 其不饱和脂肪酸

含量为 56%; 5°C 时则接近 90%。说明该菌可通过快速增加脂肪酸的不饱和度来适应低温环境。

*Psychrobacter cibarius* B5-2 中不饱和脂肪酸的含量在 5°C–30°C 的生长温度下占总脂肪酸的 90% 以上(图 4A), 表明其不饱和脂肪酸的比例几乎不受培养温度影响(表 2), 推测该菌可能还具有其他冷适应机制。文献资料也表明, 该属菌株可通过改变脂肪酸烃链长度或调节膜蛋白的机制来适应温度变化<sup>[9]</sup>。鉴于其高比例的不饱和脂肪酸, 推测可能含有高活性的去饱和酶, 本实验室已成功克隆并表征 *Psy. urativorans* 脂肪酸脱氢酶<sup>[10]</sup>。

表 2 不同生长温度下的脂肪酸组成  
Table 2 Fatty acid composition under different growth temperatures

T (°C)	Fatty acid composition (%)			
	<i>Pseudomonas putida</i> B6-2b		<i>Psychrobacter cibarius</i> B5-2	
	Saturated	Unsaturated	Saturated	Unsaturated
30	44	56	8	92
15	32	68	8	92
5	11	89	7	93

### 3 结论

本研究从低温环境的土样中共筛选出 33 株细菌。其中有革兰氏阳性菌 6 株, 革兰氏阴性菌 27 株。根据所筛细菌脂肪酸分类的多样性鉴定了其中 17 株细菌, 分布在 *Psychrobacter*、*Pseudomonas*、*Leucobacter*、*Arthrobacter*、*Acinetobacter*、*Planococcus*、*Pseudochrobactrum*、*Aequorivita*、*Sphingobacterium*、*Bacillus* 和 *Pseudoalteromonas* 11 个属, 体现了内陆土壤中嗜冷及耐冷微生物的多样性。革兰氏阳性菌的膜脂主要为分支脂肪酸, 推测分支脂肪酸是革兰氏阳性膜脂的主要适冷机制。革兰氏阴性呈现了不饱和分支和短链等多种膜脂脂肪酸调节方式, 不饱和脂肪酸构成了嗜冷及耐冷革兰氏阴性菌的主要膜脂成分。核糖体 16S rRNA 的进化树分析与细胞膜脂肪酸组成的变化趋势保持了高度的相似性。温度适应性实验表明, 同样以不饱和脂肪酸为主要膜脂成分的部分菌还呈现了不同的适冷调节机理, 也显示了适冷调节方式的多样性, 为适冷酶的开发提供了重要依据。

### 参 考 文 献

[1] Morita RV. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol Rev*, 1975(39): 146–167.  
[2] 岳喜庆, 李鹏. 嗜冷菌的研究现状以及在食品日化中的应用前景. *食品工业科技*, 2008, 29(5): 306–308.

[3] S Chintalapati, MD Kiran, S Shivaji. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. *Cell Mol Biol*, 2004, 50(5): 631–642.  
[4] Powers EM. Efficacy of Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl Environ Microbiol*, 1990(42): 1006–1014.  
[5] M Sasser. MIDI Technical Note#101: Bacterial Identification by Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acids Methyl Esters (GC-FAME). MIDI Inc: Newark, DE, USA, 2001.  
[6] IM Lee, IM Bartoszyk, DE Gundersen-rindal, et al. Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analyses. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(7): 2631–2636.  
[7] Devereux R, He SH, Doyle CL, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol*, 1990, 172(7): 3609–3619.  
[8] Fry NK, Warwick S, Saunders NA, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family Legionellaceae. *J Gen Microbiol*, 1991, 137(5): 1215–1222.  
[9] JH Yoon, KH Kang, YH Park. *Psychrobacter jeotgali* sp. nov. isolated from jeotgal a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003(53): 449–454.  
[10] Yan Li, Matthias Dietrich, Rolf D Schmid, et al. Identification and functional expression of  $\Delta 9$ -fatty acid Desaturase from *Psychrobacter urativorans* in *E. coli*. *Lipids*, 2008(44): 207–213.