

研究报告

西南地区高山湖泊中可培养细菌多样性及其
所产胞外活性物质的特性张姜¹ 黄嘉丰¹ 李艳玲² 刘丹¹ 吴日帮¹ 廖斌强¹ 雷鸣¹ 肖潇¹
武翠玲¹ 何海伦^{1*}

(1. 中南大学生命科学学院 医学遗传学国家重点实验室 湖南 长沙 410013)

(2. 中国科学院南京地理与湖泊研究所 湖泊沉积与环境演变研究室 江苏 南京 210008)

摘要:【目的】研究西南不同地区的高山湖泊中可培养细菌的多样性及其产胞外蛋白酶、纤维素酶和胞外多糖的能力。【方法】以西南4个不同地区的高山湖泊:雷波的马湖(LB)、中缅边境的凯邦亚湖(ZM)、沙德的莲花湖(SD)、腾冲的青海湖(TC)的水样为研究对象,利用稀释涂布平板方法对可培养细菌进行分离筛选,然后通过对可培养细菌的生理生化指标和16S rRNA基因序列进行分析,初步确定细菌属别;对分离得到的菌株进行产胞外蛋白酶和纤维素酶活性测定和产胞外多糖能力检测。【结果】从西南地区4个湖泊中共分离筛选得到41株细菌,其中LB 15株、ZM 13株、SD 7株、TC 6株。根据16S rRNA基因序列的系统进化分析,4个地区可培养细菌的组成和丰度存在明显差异,其中LB和ZM的优势菌属是芽孢杆菌属(*Bacillus*),其次是气单胞菌属(*Aeromonas*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*),分离的TC菌株全部属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),分离的SD菌株特异性较强。进一步酶活性和胞外多糖检测表明,分离得到的41株细菌中有28株菌的发酵产物具有蛋白酶活性,6株具有纤维素酶活性,17株可产胞外多糖(Exopolysaccharides, EPS)。其中有2株细菌同时产蛋白酶、纤维素酶和胞外多糖,10株细菌同时产蛋白酶和胞外多糖,2株细菌同时产蛋白酶和纤维素酶,1株细菌同时产纤维素酶和胞外多糖。【结论】西南4个高山湖泊中存在丰富的微生物菌种资源,且4个湖泊中筛选的可培养细菌受所处环境的影响大。其中莲花湖由于高海拔和较偏僻等特点,人为干扰小,分离得到的细菌类群与其他湖泊相比明显不同;而马湖、凯邦亚湖和青海湖3个湖泊的海拔相对较低,受人类活动影响较大,分离得到的细菌均较常见。此外高山湖泊中的可培养细菌具有分泌多种胞外活性物质特性,为工业化应用奠定了资源基础,极具更深入的开发和研究价值。

关键词: 高山湖泊, 16S rRNA 基因, 细菌多样性, 蛋白酶, 纤维素酶, 胞外多糖

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31370104); National Spark Program of China (No. 2013GA770009); Open Project of University Key Laboratory (No. 2015CNERC-CTHMP-07)

***Corresponding author:** Tel: 86-7318-2650230; E-mail: helenhe@csu.edu.cn

Received: November 23, 2016; **Accepted:** February 27, 2017; **Published online** (www.cnki.net): March 16, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370104); 国家星火计划面上项目(No. 2013GA770009); 校级重点实验室开放项目(No. 2015CNERC-CTHMP-07)

***通讯作者:** Tel: 86-7318-2650230; E-mail: helenhe@csu.edu.cn

收稿日期: 2016-11-23; **接受日期:** 2017-02-27; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-03-16

Diversity of culturable bacteria and their extracellular active substance properties in alpine lakes of Southwest China

ZHANG Jiang¹ HUANG Jia-Feng¹ LI Yan-Ling² LIU Dan¹ WU Ri-Bang¹
LIAO Bin-Qiang¹ LEI Ming¹ XIAO Xiao¹ WU Cui-Ling¹ HE Hai-Lun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Medical Genetics, School of Life Science, Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

(2. Laboratory of Lake Sediments and Environmental Evolution, Nanjing Institute of Geography and Limnology Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: [Objective] The main aim of this study is to study the diversity of culturable bacteria in alpine lakes of different regions located in Southwest China, and to analyze their capabilities for producing proteases, cellulases and exopolysaccharides. [Methods] Four water samples in different alpine lakes located in Southwest China, including Horse Lake in Leibo (LB), Kanbon sub Lake in Sino-Burmese border (ZM), Lotus Lake in Shade (SD) and Qinghai Lake in Tengchong (TC), were collected to isolate the cultural bacteria based on the spread plate method. The genera of culturable bacteria were identified by analyzing the physiological and biochemical indexes and 16S rRNA gene sequences. The strains were further detected for production of proteases, cellulases and exopolysaccharides. [Results] A total of 41 strains were isolated from four lakes in southwestern China, of which 15 strains from LB, 13 strains ZM, 7 strains SD and 6 strains TC. According to phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences, there were obvious differences in composition and abundance of culturable bacteria among four lakes. The dominant genus was *Bacillus*, and followed by *Aeromonas* and *Pseudomonas* in LB and ZM. All isolates were *Bacillus* in TC, whereas strains were highly specific in SD. Further research on enzyme activities and exopolysaccharides were detected in 41 cultural bacteria, of which 28 strains had protease activity, 6 strains had cellulase activity and 17 strains produced exopolysaccharides (EPS). In addition, 2 strains produced proteases, cellulases and exopolysaccharides simultaneously, 10 strains produced proteases and exopolysaccharides, 2 strains produced proteases and cellulases, and only 1 strain produced cellulases and exopolysaccharides. [Conclusion] The culturable bacteria in alpine lakes were capable of secreting various extracellular active substances, with potential for further development and research.

Keywords: Alpine lake, 16S rRNA gene, Biodiversity, Protease, Cellulase, Exopolysaccharides

高山湖泊是指位于地势较高的由地表的洼地蓄水而成的水域^[1]。高山湖泊大多地处偏僻,较少受到人为活动的影响,而且长期处于低温寒冷和寡营养的状态^[2-4]。以中国云南、四川、青藏等5个省份为代表的西南地区分布着数量众多的高山湖泊,该地区湖泊一般具有水深暗陡的形态特征,湖泊换水周期长,生态系统较脆弱^[5]。高山湖泊生态系统中的微生物是一个多元化群体生态系统的有机组成部分,参与湖泊生态系统中绝大多数生物活性元素的形态转化和地球化学循环,并与它们所处的环境互利共生、相互影响^[6]。高山湖泊生态系统中的微生物除了具有生物学意义外,也是全球气候

变化、人类活动对生态环境影响的敏感指示器^[7]。研究表明,高山地区对全球气候变暖具有放大作用,高海拔地区的气温增长趋势明显高于低海拔地区^[8-9]。因此,对高山湖泊系统中可培养微生物的物种组成和生态特征进行研究具有重要意义。

早在20世纪末,美国、澳大利亚、英国等国家的微生物学者和地质学家开始对湖泊中的微生物群落特征、多样性与其水体化学特征的关系以及从湖泊微生物生态及水文等多方面研究了高山湖泊对工业化和气候变化的响应^[10-16]。Zwart等^[17]对世界各地11个湖泊和2个河流的细菌16S rRNA基因序列研究表明,淡水中细菌主要由 α -、 β -Proteobacteria和

CFB、Actinobacteria、Verrucomicrobia 组成。与其他国家相比,国内对高山湖泊中微生物的研究还在起步阶段,并且研究领域较有限,研究最多的地区主要集中在青藏高原。近年来,关于青藏高原高山湖泊微生物多样性及所产胞外分泌物的研究工作表明,其高山湖泊中含有很高的细菌群落多样性,主要包括 α -、 β -、 γ -Proteobacteria 和 Actinobacteria、Cyanobacteria、CFB 等^[18]。青藏高原高山湖泊的细菌与其它高山湖泊有相同的优势菌群 β -Proteobacteria^[18-20]。另外,从高山湖泊中也分离、筛选出了大量可培养的嗜冷菌及其所产的胞外嗜冷酶和胞外多糖等^[7]。细菌胞外酶的种类有很多,如蛋白酶和纤维素酶等。微生物分泌的胞外蛋白酶在氮代谢和氮循环过程中扮演了重要角色^[21]。纤维素酶是由多种水解酶组成的一个复杂酶系,在分解纤维素时起生物催化作用。在各种水生环境中,细菌可以通过产生纤维素酶降解水中的纤维素为自身提供葡萄糖等各种碳源。胞外多糖(EPS)是各类微生物常分泌的一种胞外高分子有机聚合物。胞外多糖在帮助细菌的黏附以及在低温和寡营养的水生环境中存活和生长具有重要的作用^[22]。因此,对高山湖泊极端环境分泌的胞外分泌物进行系统研究有助于发现新型蛋白酶、纤维素酶和胞外多糖,也为解析微生物及其胞外分泌物与环境之间的相互影响提供了科学依据。

由于西南地区山地地形复杂,经向、纬向跨度和垂直高差均很大,且常年受亚热带季风和高原气候影响,西南地区湖泊历来都是研究者们进行气候演化和地质活动及湖泊生态系统等方面研究的热点所在。然而对高山湖泊中微生物的多样性及其所产胞外分泌物的研究较少,特别是对可培养细菌的物种组成与环境之间的关系方面的报道更为有限。对该生态条件下的微生物进行系统深入的研究,有助于对西南地区气候、地质演化及与人类活动影响关系的认识。本文选取了西南地区海拔高于 1 100–4 200 m 之间的 4 个湖泊为研究对象,通过对这 4 个高山湖泊中可培养细菌的分离纯化及 16S

rRNA 基因序列分析,探讨各个高山湖泊中可培养细菌的组成情况,并对它们分泌的胞外蛋白酶、纤维素酶和胞外多糖进行了系统的比较研究,揭示了 4 个不同西南高山湖泊的可培养细菌及产胞外分泌物的多样性与生存环境之间的关系,为揭示微生物在该环境中可能的作用提供了重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品采集: 从云南雷波的马湖(103°15'36.5"E, 28°6'36.1"N)、中缅边境的凯邦亚湖(97°37'12.4"E, 24°37'24.4"N)、沙德的莲花湖(101°12'36.4"E, 29°26'24.9"N)和四川腾冲的青海湖(98°22'12.3"E, 24°35'24.4"N) 4 个湖泊采集水样(图 1), 4 个湖泊的海拔高度分别为 1 100、1 312、4 200 和 1 950 m。样品放置 4 °C 保存, 然后进行菌株的筛选。

1.1.2 主要试剂和仪器: 刚果红染色液(1 g/L)、1 mol/L NaCl 溶液、3,5-二硝基水杨酸、氢氧化钠、四水酒石酸钾钠、重蒸苯酚、无水亚硫酸钠、葡萄糖均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Biospin 基因组提取试剂盒购自杭州博日公司; PCR 产物纯化试剂盒购自美国 Omega 公司。PCR 仪,

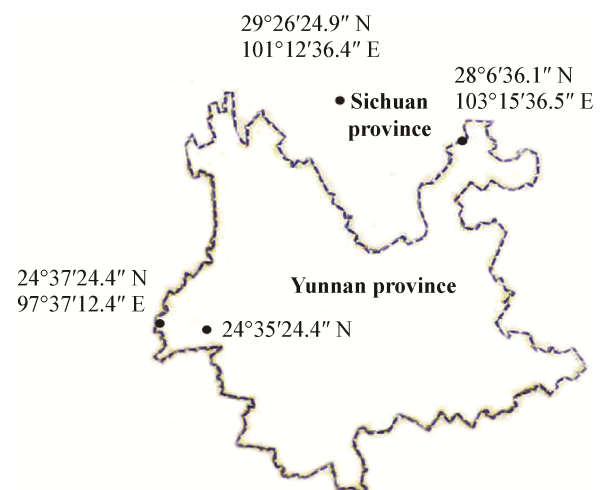


图 1 西南地区 4 个采样点的地理位置

Figure 1 Geographical location of four sampling sites in Southwest China

北京东胜创新生物科技有限公司；高压蒸汽灭菌锅，上海华线医用核子仪器有限公司；恒温振荡培养箱，太仓市豪诚实验仪器制造有限公司；凝胶成像仪、电泳仪，Bio-Rad 公司。

1.1.3 分离培养基：(1) LB 培养基(g/L)：蛋白胨 10.0，酵母提取液 5.0，氯化钠 10.0，pH 7.0。98 kPa 灭菌 30 min。

(2) LB 琼脂培养基(g/L)：蛋白胨 10.0，酵母提取液 5.0，氯化钠 10.0，琼脂 20.0，pH 7.0。98 kPa 灭菌 30 min。

1.1.4 筛选培养基：(1) 蛋白酶筛选培养基(g/L)：脱脂牛奶 10.0，蛋白胨 5.0，酵母提取液 1.0，琼脂 20.0，pH 7.0。98 kPa 灭菌 30 min。

(2) 纤维素酶筛选培养基(g/L)：羧甲基纤维素钠 20.0，蛋白胨 5.0，酵母提取液 1.0，琼脂 20.0，pH 7.0。98 kPa 灭菌 30 min。

(3) 胞外多糖筛选培养基(g/L)：葡萄糖 30.0，蛋白胨 5.0，酵母提取液 1.0，琼脂 20.0，pH 7.0。68 kPa 灭菌 20 min。

1.1.5 发酵培养基：(1) 蛋白酶和纤维素酶发酵培养基(g/L)：玉米粉 20.0，麸皮 10.0，豆粕 10.0， Na_2HPO_4 1.0， KH_2PO_4 0.3， CaCl_2 1.0， Na_2CO_3 1.0，pH 7.0。98 kPa 灭菌 30 min。

(2) 胞外多糖发酵培养基(g/L)：葡萄糖 30.0，蛋白胨 5.0，酵母提取液 1.0，pH 7.0。68 kPa 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株的富集和分离纯化：采集的水样分别稀释成 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 3 个梯度直接涂布在基础培养平板上，18 °C 培养 2–3 d 长出单菌落，挑取单菌落划线进行分离纯化，直到得到纯培养菌株。用 4 °C 固体斜面 and -80 °C 甘油管两种方式保存菌种。

1.2.2 菌株的外观特征及部分生理生化指标检测：平板划线方法接种细菌于固体基础培养基上，18 °C 培养 2–3 d，观察单菌落的形态、颜色、大小、透明度、边缘及表面特征等。通过形态观察及镜检确定菌株种类，然后依据《常见细菌系统鉴定手册》^[23]

和《伯杰氏细菌鉴定手册》^[24]进行生理生化指标检测。

1.2.3 细菌总 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增和系统进化分析：使用 Biospin 基因组提取试剂盒提取细菌总 DNA，以细菌总 DNA 为模板，采用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。20 μL 反应体系：10 \times Taq buffer 2.0 μL ，dNTPs (10 mmol/L) 0.4 μL ， MgCl_2 (25 mmol/L) 1.2 μL ，ddH₂O 15.4 μL ，50 $\mu\text{mol/L}$ 27F 和 1492R 各 0.25 μL ，Taq DNA polymerase (5 U/ μL) 0.2 μL ，模板 DNA 0.3 μL 。反应条件：95 °C 2 min；95 °C 30 s，55 °C 1 min，72 °C 90 s，30 个循环；72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后，再按照 PCR 产物纯化试剂盒回收目的 DNA，通过连接、转化过程，经菌落 PCR 验证的转化子送交至华大基因公司测序。测序得到的 16S rRNA 基因序列通过 BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行序列比对。

1.3 产胞外蛋白酶、纤维素酶和胞外多糖菌株的筛选

1.3.1 产胞外蛋白酶菌株的筛选：在蛋白酶筛选培养基中采用系列划线方法获得单克隆菌落，18 °C 培养 2–3 d 后观察有无透明圈出现。

1.3.2 产纤维素酶菌株的筛选：在纤维素酶筛选培养基上采用系列划线方法获得单克隆菌落，18 °C 培养 2–3 d 后在平板中加入 1 g/L 的刚果红染色液反应 30 min，再加入 1 mol/L NaCl 溶液脱色 10 min 后，观察有无透明圈出现。

1.3.3 产胞外多糖菌株的筛选：在胞外多糖筛选培养基上采用系列划线方法获得单克隆菌落，18 °C 培养 2–3 d 后进行拉丝实验。

1.4 细菌产蛋白酶、纤维素酶和胞外多糖的发酵培养方法

1.4.1 细菌产蛋白酶和纤维素酶的发酵培养方法：取 OD_{600} 值是 0.8 的对数生长期的新鲜菌液 1 mL 加入到 50 mL 蛋白酶和纤维素酶发酵培养基中，18 °C、

180 r/min 培养 5 d。收集发酵液在 4 °C、11 000 r/min 离心 30 min 后得到的上清液即为粗酶液。

1.4.2 细菌产胞外多糖的发酵培养方法: 取对数生长期的新鲜菌液 1 mL 加入到 50 mL 胞外多糖发酵培养基中, 18 °C、180 r/min 培养 5 d。收集发酵液在 4 °C、11 000 r/min 离心 30 min 后得到的上清液即为粗糖液。

1.5 酶活性测定方法

1.5.1 蛋白酶活性测定方法: 采用 Folin-酚法测定细菌发酵液中的蛋白酶活性, 结合胞外酶谱法确定蛋白酶的组成和活性^[25]。

1.5.2 纤维素酶活性测定方法: 采用羧甲基纤维素钠盐酶活性法测定细菌发酵液中的纤维素酶含量, 结合胞外酶谱法确定纤维素酶的组成和活性^[26]。

1.5.3 胞外多糖活性测定方法: 通过无水乙醇沉淀法分离发酵液中的细菌胞外多糖, 离心后重溶, 再采用硫酸-苯酚法测定其中的胞外多糖含量^[27]。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离鉴定及部分生理生化性质的鉴定

对 4 个不同地区的高山湖泊水样进行涂布, 从 3 个不同剂量涂布的平板中挑选出涂布均匀且单菌落较多的平板, 从中挑取单菌落接种于基础培养基, 置于 18 °C 培养 2–3 d, 通过形态观察确定菌株种类, 共获得细菌 41 株。其中雷波(LB) 15 株, 中缅边境(ZM) 13 株, 沙德(SD) 7 株, 腾冲(TC) 6 株。分离得到的单菌落经 16S rRNA 基因序列测序分析显示, 雷波马湖中分离的 15 株菌中包括芽孢杆菌 9 株, 假单胞菌 3 株, 气单胞菌 2 株, 微杆菌 1 株; 中缅边境凯邦亚湖中分离得到芽孢杆菌 2 株, 假单胞菌和气单胞菌各 4 株, 类芽孢杆菌 3 株; 沙德莲花湖中得到假单胞菌 2 株, 鞘氨醇杆菌、不动杆菌、贪噬菌、黄杆菌和成团泛菌各 1 株; 腾冲青海湖中分离得到的全部是芽孢杆菌共 6 株(图 2)。最后将分离得到的菌株进行生理生化指标检测(表 1)。

从 4 个湖泊中分离的菌株隶属于 10 个不同的

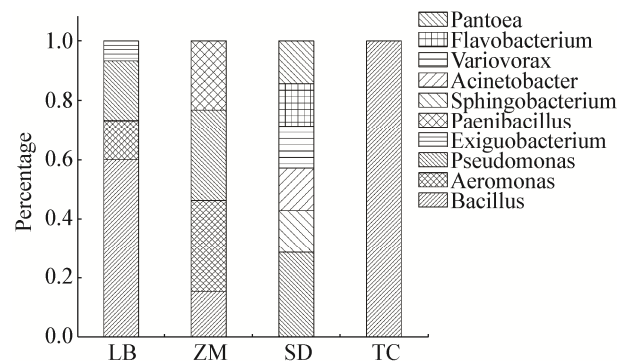


图 2 西南地区 4 个采样点的细菌相对丰度图

Figure 2 The relative abundance of bacteria in four sampling sites in Southwest China

种属类群, 其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)的菌株最多, 其次是假单胞菌属(*Pseudomonas*)和气单胞菌属(*Aeromonas*)。通过观察 4 个地区的可培养细菌丰度组成, 发现不同地区存在明显差异, 其中雷波马湖和中缅边境凯邦亚湖分离得到的细菌均较常见, 而且芽孢杆菌是优势菌株, 类似的细菌种类组成也出现在其他地区的淡水湖泊中^[28-29]。腾冲青海湖的细菌群落组成比较单一, 均为芽孢杆菌, 这可能是由于腾冲受地热影响, 水温较高, 而芽孢杆菌本身具有较好的耐热能力, 因此只有该菌得以存活, 成为优势菌群; 而莲花湖筛选得到的细菌多样性最高, 相比其他淡水湖泊中的细菌类群大多数属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和气单胞菌属(*Aeromonas*)等^[30-31], 莲花湖筛选得到的细菌主要由假单胞菌属(*Pseudomonas*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)和成团泛菌属(*Pantoea*)组成。考虑到雷波马湖作为我国已知的第三大高山深水湖泊以及中缅边境凯邦亚湖特殊的地理位置, 还有腾冲青海湖美丽的自然风光等, 近年来这 3 个高山湖泊均成为了著名的旅游景区, 受人为活动干扰较大。然而海拔高度位于 4 000 m 以上的沙德莲花湖位置比较偏僻, 人迹罕至, 受当地人类活动影响较小, 这可能是造成菌株组成差异较大的主要原因。

表 1 西南高山湖泊细菌的种属分类、部分生理生化性质及产胞外活性物质多样性
Table 1 Species classification, some physiological and biochemical properties, and extracellular-active substance diversity in alpine lakes of Southwest China

地区 Region	菌株 Strains	接触酶 Catalase	氧化酶 Oxidase	V-P 试验 V-P test	H ₂ S 反应 H ₂ S reaction	硝酸盐还原反应 Nitrate reduction reaction	革兰氏染色 Gram stain	蛋白酶 Protease	纤维素酶 Cellulase	胞外多糖 Exopolysaccharides
LB	<i>Bacillus</i> sp. LB1	+	+	-	-	+	+	-	-	+
	<i>Exiguobacterium</i> sp. LB2	+	+	+	-	-	+	+++	-	-
	<i>Bacillus</i> sp. LB3	+	+	-	-	+	+	+	-	+
	<i>Bacillus</i> sp. LB4	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	<i>Aeromonas</i> sp. LB5	+	+	+	+	+	-	+	-	-
	<i>Pseudomonas</i> sp. LB6	+	+	-	-	+	-	+	+	-
	<i>Aeromonas</i> sp. LB7	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	<i>Bacillus</i> sp. LB8	+	+	-	-	+	+	+	-	-
	<i>Pseudomonas</i> sp. LB9	+	+	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Bacillus</i> sp. LB10	+	+	-	-	+	+	+	-	-
	<i>Pseudomonas</i> sp. LB11	+	+	-	-	+	-	+	-	+
	<i>Bacillus</i> sp. LB12	+	+	+	-	+	+	+++	++	+
	<i>Bacillus</i> sp. LB13	+	+	+	-	+	+	-	-	-
	<i>Bacillus</i> sp. LB14	+	+	-	-	+	+	+	-	+
	<i>Bacillus</i> sp. LB15	+	+	+	-	+	+	+	-	-
ZM	<i>Bacillus</i> sp. ZM1	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	<i>Aeromonas</i> sp. ZM2	+	+	+	+	+	-	++	-	+
	<i>Aeromonas</i> sp. ZM3	+	+	+	+	+	-	+++	-	++
	<i>Bacillus</i> sp. ZM4	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	<i>Pseudomonas</i> sp. ZM5	+	+	-	-	+	-	+	-	-
	<i>Paenibacillus</i> sp. ZM6	+	+	-	-	-	+	-	+	-
	<i>Aeromonas</i> sp. ZM7	+	+	+	+	+	-	+++	-	+
	<i>Paenibacillus</i> sp. ZM8	+	+	-	-	-	+	++	-	-
	<i>Pseudomonas</i> sp. ZM9	+	+	-	-	+	-	+++	-	+
	<i>Aeromonas</i> sp. ZM10	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	<i>Pseudomonas</i> sp. ZM11	+	+	-	-	+	-	-	-	+
	<i>Paenibacillus</i> sp. ZM12	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	<i>Pseudomonas</i> sp. ZM13	+	+	-	-	+	-	+	-	-
SD	<i>Sphingobacterium</i> sp. SD1	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	<i>Acinetobacter</i> sp. SD2	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Variovorax</i> sp. SD3	+	+	-	-	-	+	-	-	-
	<i>Pseudomonas</i> sp. SD4	+	+	-	-	+	-	+	-	-
	<i>Flavobacterium</i> sp. SD5	+	+	-	+	+	-	++	-	-
	<i>Pseudomonas</i> sp. SD6	+	+	-	-	+	-	-	-	-
	<i>Pantoea</i> sp. SD7	+	-	-	-	+	-	-	-	-
TC	<i>Bacillus</i> sp. TC1	+	+	+	-	+	+	+	-	+++
	<i>Bacillus</i> sp. TC2	+	+	+	-	+	+	+	-	+
	<i>Bacillus</i> sp. TC3	+	+	-	-	+	+	++	+	+
	<i>Bacillus</i> sp. TC4	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	<i>Bacillus</i> sp. TC5	+	+	-	-	-	+	+	-	+
	<i>Bacillus</i> sp. TC6	+	+	+	-	+	+	-	+	++

注：-：阴性/没有活性；+：阳性/活性一般；++：阳性/活性较高；+++：阳性/活性高。

Note: -: Negative reaction/No activity; +: Positive reaction/Moderate activity; ++: Positive reaction/High activity; +++: Positive reaction/Very high activity.

2.2 细菌产胞外分泌物的多样性分析

对分离纯化到的 41 株细菌进行了发酵培养, 对发酵液中的蛋白酶、纤维素酶活性及胞外多糖的产生情况进行了比较分析(表 1)。对筛选的 41 株细菌进行胞外酶活性检测, 结果显示有 28 株细菌具有蛋白酶活性, 其中 *Exiguobacterium* sp. LB2、*Bacillus* sp. LB12、*Aeromonas* sp. ZM2、*Aeromonas* sp. ZM3、*Aeromonas* sp. ZM7、*Paenibacillus* sp. ZM8、*Pseudomonas* sp. ZM9、*Flavobacterium* sp. SD5、*Bacillus* sp. TC3 这 9 株细菌产蛋白酶的能力较强; *Pseudomonas* sp. LB6、*Bacillus* sp. LB12、*Paenibacillus* sp. ZM6、*Aeromonas* sp. ZM10、*Bacillus* sp. TC3、*Bacillus* sp. TC6 这 6 株细菌具有纤维素酶活性, 其中 *Bacillus* sp. LB12 的发酵产物的纤维素降解能力最强(图 3)。此外通过拉丝实验初步检测分离得到的细菌产胞外多糖的能力(图 4A), 结果显示有 17 株细菌具有产胞外多糖能力, 其中 *Aeromonas* sp. LB7、*Bacillus* sp. LB12、*Aeromonas* sp. ZM3、*Bacillus* sp. TC1 和 *Bacillus* sp. TC6 这 5 株细菌产胞外多糖能力较强(图 3)。根据硫酸-苯酚法检测细菌发酵液中胞外多糖总量发现, *Bacillus* sp. TC1 产胞外多糖含量最高, 多糖产量为 0.61 g/L; 其次是 *Bacillus* sp. TC6、*Aeromonas* sp. ZM3、*Bacillus* sp. LB12 和 *Aeromonas* sp. LB7, 胞外多糖含量分别为 0.54、0.50、0.32 和 0.25 g/L(图 4B)。从表 1 还可以看出, 其中 *Bacillus* sp. LB12 和 *Bacillus* sp. TC3 能产生 3 种胞外分泌物, 而 *Bacillus* sp. LB3、*Pseudomonas* sp. LB11、*Bacillus* sp. LB14、*Aeromonas* sp. ZM2、*Aeromonas* sp. ZM3、*Aeromonas* sp. ZM7、*Pseudomonas* sp. ZM9、*Bacillus* sp. TC1、*Bacillus* sp. TC2 和 *Bacillus* sp. TC4 既产胞外蛋白酶, 又产胞外多糖; *Pseudomonas* sp. LB6 和 *Aeromonas* sp. ZM10 既产胞外蛋白酶, 又产纤维素酶; *Bacillus* sp. TC6 既产纤维素酶, 又产胞外多糖。通过比较 4 个不同地区高山湖泊的可培养细菌产胞外活性物质的分泌情况, 结果发现, 从雷波马湖分离得到的产蛋白酶的细菌菌株最多, 其中多为芽孢

杆菌属(*Bacillus*), 占分离菌株的 46.7%; 腾冲青海湖和雷波马湖分离得到的细菌分泌胞外多糖最多, 特别是腾冲青海湖分离得到的所有菌株(芽孢杆菌)都可以分泌胞外多糖, 占分离菌株的 100%, 雷波马湖分泌胞外多糖的芽孢杆菌属(*Bacillus*)占分离菌株的 26.7%; 而 4 个湖泊中分泌纤维素酶的细菌均较少(表 1)。由此可以推测, 这 4 个湖泊中蛋白酶资源相对比较丰富, 而可培养细菌大都不是通过降解纤维素来获取碳源。细菌胞外多糖的分泌有利于细菌捕获环境中的有机物质, 供给自身生长需要。腾冲青海湖中分离得到的芽孢杆菌都可以分泌胞外多糖, 可能是它们对地热生存环境的一种适应。

2.3 细菌产蛋白酶和纤维素酶的活性电泳图谱分析和酶活测定

对产蛋白酶明显的细菌进行摇瓶发酵实验, 取第 5 天的粗酶液进行底物反浸聚丙烯酰胺凝胶活性电泳图谱分析, 确定蛋白酶的种类和酶活力。如图 5 所示, 酶谱结果表明不同属的细菌产蛋白酶的能力和类型均明显不同。*Exiguobacterium* sp. LB2、*Bacillus* sp. LB12、*Aeromonas* sp. ZM3、*Aeromonas* sp. ZM7 和 *Pseudomonas* sp. ZM9 的酶谱条带均较明亮, 说明这几株菌的胞外蛋白酶活性较强; 而 *Aeromonas* sp. ZM2、*Paenibacillus* sp. ZM8、*Flavobacterium* sp. SD5 和 *Bacillus* sp. TC3 的蛋白酶活性相对较低。*Exiguobacterium* sp. LB2、*Bacillus* sp. LB12、*Pseudomonas* sp. ZM9、*Flavobacterium* sp. SD5 和 *Bacillus* sp. TC3 胞外活性酶谱有 3 条非常明显的降解条带, *Aeromonas* sp. ZM2 和 *Aeromonas* sp. ZM3 胞外活性酶谱有 2 条明显的降解条带; *Aeromonas* sp. ZM7 和 *Paenibacillus* sp. ZM8 胞外蛋白酶条带较为单一。此外, 由图 5 可知, 同属的细菌产蛋白酶的种类也存在明显差异, 例如 *Aeromonas* sp. ZM3 产 2 种不同类型的蛋白酶, 而 *Aeromonas* sp. ZM7 只产 1 种类型的蛋白酶, 而且 *Aeromonas* sp. ZM7 蛋白酶谱上的降解条带比 *Aeromonas* sp. ZM3 更明显, 不同细菌所产胞外蛋白酶明显具有多样性。

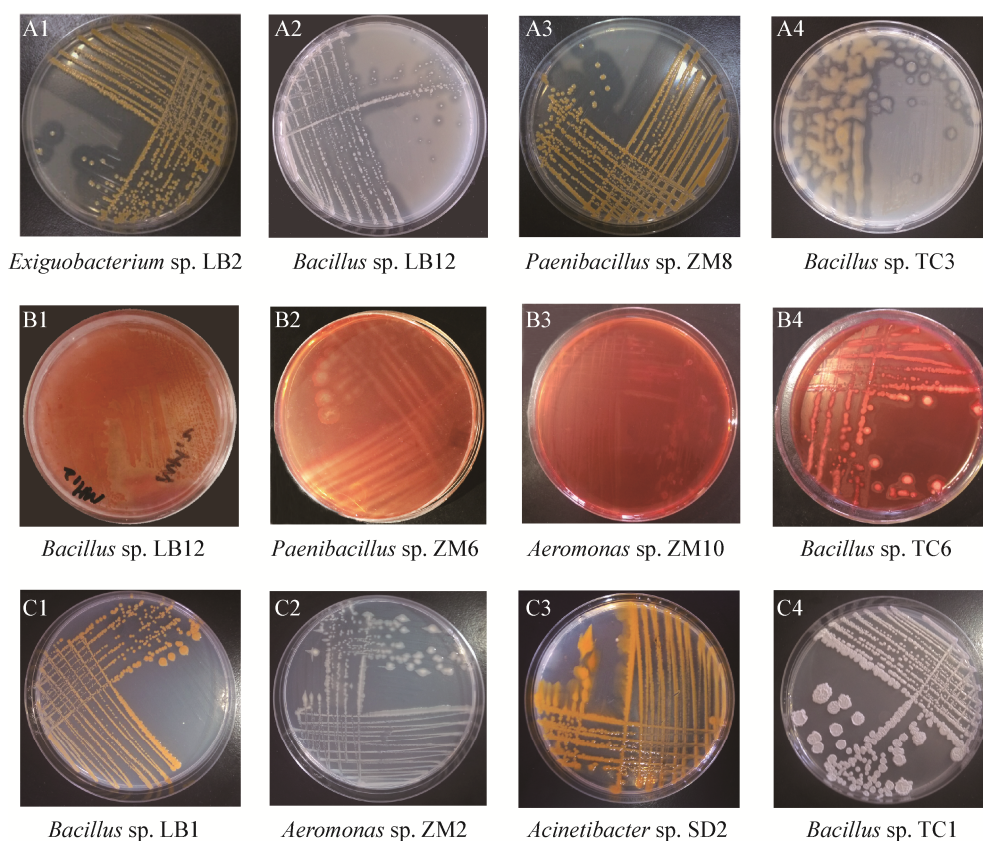
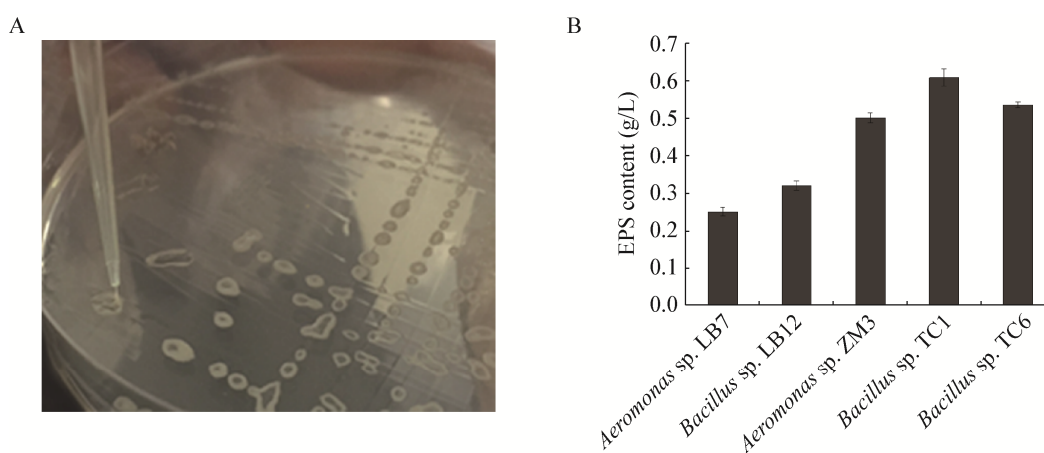


图3 部分菌株活性物质筛选图片

Figure 3 Screening active substances in some strains

注：A1-A4：部分菌株蛋白酶活性圈；B1-B4：部分菌株纤维素酶活性圈；C1-C4：部分菌株多糖能力检测。

Note: A1-A4: The protease circle of partial strains; B1-B4: The cellulase circle of partial strains; C1-C4: Detection of exopolysaccharides (EPS) ability of partial strains.

图4 细菌 *Aeromonas* sp. ZM3 多糖拉丝实验(A)和部分细菌胞外多糖(EPS)含量测定(B)Figure 4 *Aeromonas* sp. ZM3 polysaccharide drawing test (A) and detection of exopolysaccharides (EPS) content of partial strains (B)

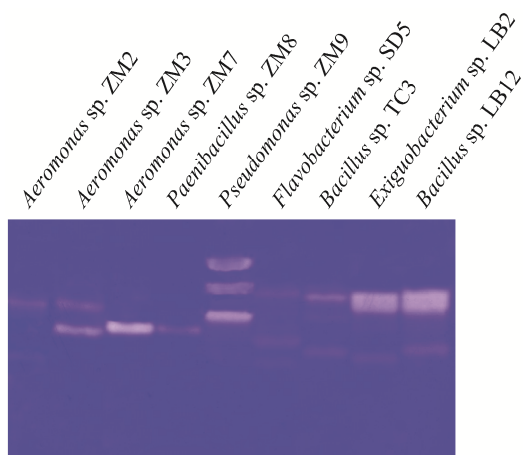


图 5 部分菌株胞外蛋白酶的活性电泳图谱

Figure 5 SDS-PAGE analysis of cellulase activity in partial strains

取发酵到第 5 天的粗酶液, 采用 Folin-酚法进一步比较不同细菌发酵液的蛋白酶活性。如图 6 所示, *Exiguobacterium* sp. LB2 的胞外蛋白酶相对活性最高, 而 *Aeromonas* sp. ZM3、*Aeromonas* sp. ZM7、*Pseudomonas* sp. ZM9、*Aeromonas* sp. ZM2、*Paenibacillus* sp. ZM8、*Flavobacterium* sp. SD5 和 *Bacillus* sp. TC3 的蛋白酶相对活性较低。蛋白酶酶活测定结果和活性电泳图谱结果基本吻合。

对产纤维素酶的 6 株细菌进行发酵, 取第 5 天粗酶液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱分析。如图 7

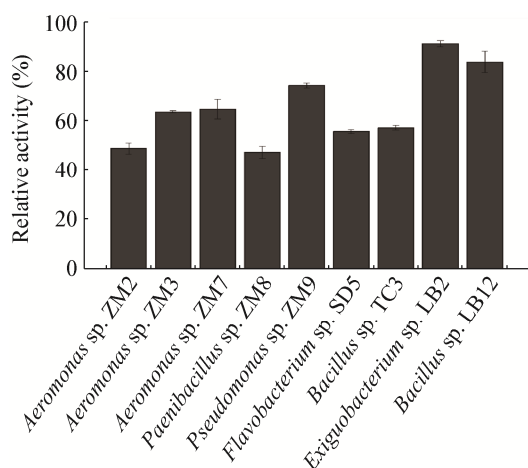


图 6 部分菌株的蛋白酶活性结果图

Figure 6 Protease activity of partial strains

注: 以 *Exiguobacterium* sp. LB2 酶活性的最大值为 100%。

Note: The maximum enzyme activity of *Exiguobacterium* sp. LB2 was 100%.

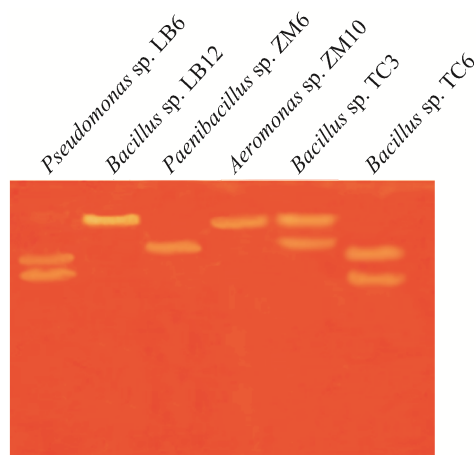


图 7 部分菌株纤维素酶的活性电泳图谱

Figure 7 SDS-PAGE analysis of cellulase activity in partial strains

所示, *Bacillus* sp. LB12 的纤维素酶谱条带最亮, 且只产 1 种类型的纤维素酶, 产酶类型比较单一; 同样只产 1 种类型纤维素酶菌株还有 *Paenibacillus* sp. ZM6 和 *Aeromonas* sp. ZM10; 而 *Pseudomonas* sp. LB6、*Bacillus* sp. TC3 和 *Bacillus* sp. TC6 的活性电泳图上均有 2 条明显的纤维素降解条带。通过羧甲基纤维素钠盐酶活性方法测定了发酵液中的纤维素酶活性(图 8) 与聚丙烯酰胺凝胶电泳图结果基本一致。

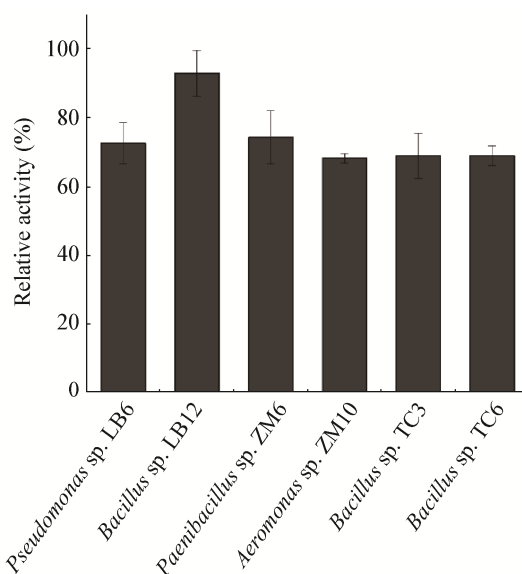


图 8 部分菌株的纤维素酶活结果图

Figure 8 Cellulase activity of partial strains

注: 以 *Bacillus* sp. LB12 酶活性的最大值为 100%。

Note: The maximum enzyme activity of *Bacillus* sp. LB12 was 100%.

3 讨论

Peeters 等在对南极洲 Forlidas Pond 和 Lundström Lake 中的可培养细菌多样性进行研究时,也是对每个湖泊的一个采样点取样进行可培养细菌的筛选,然后对两个不同地区细菌组成进行比较,通过 16S rRNA 基因序列结果分析比对,表明 82 个代表菌株属于四大细菌群落^[29]。在本实验中,我们采用了类似的取样方式,对不同湖泊中的可培养细菌进行分离、筛选,通过 16S rRNA 基因序列分析得到的细菌主要是芽孢杆菌属、假单胞菌属、气单胞菌属等,相关数据一定程度上反映了湖泊中微生物区系的变化。

本课题组从 4 个不同的湖泊中分离筛选出细菌 41 株,根据细菌的生理生化性质及 16S rRNA 基因序列进行分析,发现雷波马湖、中缅边境凯邦亚湖和腾冲青海湖的优势菌属均是芽孢杆菌,表明芽孢杆菌在高山淡水湖泊中有着举足轻重的作用。除了芽孢杆菌外,假单胞菌和气单胞菌在雷波马湖和中缅边境凯邦亚湖中也占有很大的比例。刘文等^[32]在研究青藏高原北部湖泊中可培养细菌对不同碳源利用情况的过程中也发现了大量假单胞菌和气单胞菌,它们可以利用多种碳源,是高山淡水湖泊碳循环过程的重要参与者。然而韩永和等^[33]的研究显示,假单胞菌广泛分布于淡水系统中,参与了淡水湖泊的有机氮循环过程。因此雷波马湖和中缅边境凯邦亚湖湖泊中大量存在假单胞菌和气单胞菌两种细菌,同样预示着它们在该湖泊的碳循环和氮循环过程中具有重要的作用。沙德莲花湖中分离得到的可培养细菌种类最多,且细菌种类均较罕见,这可能与该湖泊远离人类有关,这也为下一步剖析原生态的高山湖泊微生物生态学意义提供了合适的研究对象。刘晓波等通过研究青藏高原纳木错湖等高山湖泊的细菌群落特征发现,青藏高原高山湖泊中的优势菌属主要是嗜氢菌属(*Hydrogenophaga*)、诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、原绿球菌属(*Prochlorococcus*)、红曲霉属(*Hongiella*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*)^[7],

这与本文西南高原湖泊的研究结果有较大的差异。细菌种类与湖泊的多项物理化学参数有关,是多种参数如湖泊的海拔高度、地形地貌、汇水方式、面积大小、营养状况共同作用的结果^[7]。本实验选取的 4 个高山湖泊与青藏高原纳木错湖都是地处偏远地区、低温和寡营养的高山湖泊,但由于所处位置不同,湖泊的营养状况差距不小,且湖泊受人为干预和气候影响等也均有明显的区别,因此西南地区选取的 4 个湖泊的细菌丰度和组成与青藏高原的高山湖泊有着明显的不同。这也为下一步深入分析和探讨西南地区其他高山湖泊的微生物多样性提供了可靠的参考价值。

本实验采用平板水解圈法和拉丝实验针对几种实用的胞外活性物质进行测定,筛选结果显示分离的 41 株细菌中分别有 68.3%和 43.9%的可培养菌株产蛋白酶和胞外多糖,只有 14.6%的可培养菌株产纤维素酶。通过分析西南地区 4 个不同湖泊的可培养细菌产胞外活性物质情况,发现雷波马湖中产蛋白酶、纤维素酶和胞外多糖这 3 种胞外活性物质的菌株最多,且绝大部分是芽孢杆菌。此外,腾冲青海湖中产蛋白酶、纤维素酶和胞外多糖最多的菌株也是芽孢杆菌。据此可以推断,芽孢杆菌在参与雷波马湖和腾冲青海湖中氮循环和碳循环过程中发挥着重要的作用。同时,我们发现不同的菌株产胞外活性物质的能力也存在明显的不同,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*),如菌株 *Bacillus* sp. LB12 可以同时具有产 3 种实用功能的胞外活性物质的能力,而大部分细菌只具有产 1 种胞外活性物质的能力,这也再一次印证了芽孢杆菌属(*Bacillus*)在西南高山湖泊的重要性。

本研究以西南地区 4 个不同高山湖泊中可培养细菌和它们所产的胞外活性物质为对象,通过比较湖泊中的细菌丰度组成,分析各个地区细菌多样性存在差异的可能原因,有助于后期全面、系统地对西南湖泊中的细菌多样性开展生态学研究,对于将来更好地管理和维护高山湖泊生态环境具有深远意义。同时,通过研究细菌所产的几种实用的胞外

活性物质的多样性, 为深入阐述细菌及其胞外活性物质在高山湖泊中所起的重要角色以及对环境的定点监测和保护打下了坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Gong SJ, Wu L, Li SG. Studying on lake microbial diversity[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(4): 54-57 (in Chinese)
龚世杰, 吴兰, 李四光. 湖泊微生物多样性研究进展[J]. *生物技术通报*, 2008(4): 54-57
- [2] Pechlaner R. Factors that control the production rate and biomass of phytoplankton in high mountain lakes[J]. *Mitt Internat Verein Limnol*, 1971, 19: 123-145
- [3] Patrick S, Battarbee RW, Wathne B, et al. Measuring and modelling the dynamic response of remote mountain lake ecosystems to environmental change: an introduction to the MOLAR project[J]. *Verh Internat Verein Limnol*, 1998(248): 403-410
- [4] Liu YQ, Yao TD, Jiao NZ, et al. Microbial community structure in moraine lakes and glacial meltwaters, Mount Everest[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 265(1): 98-105
- [5] Li XL, Li AN, Liu GX, et al. Spatial distribution pattern of the lakes in the Yunnan-Guizhou Plateau[J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2010, 19(Z1): 90-96 (in Chinese)
李晓铃, 李爱农, 刘国祥, 等. 云贵高原区湖泊空间分布格局[J]. *长江流域资源与环境*, 2010, 19(Z1): 90-96
- [6] Ren LJ, He D, Xing P, et al. Bacterial diversity and ecological function in lake water bodies[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 421-432 (in Chinese)
任丽娟, 何聘, 邢鹏, 等. 湖泊水体细菌多样性及其生态功能研究进展[J]. *生物科学*, 2013, 21(4): 421-432
- [7] Liu XB, Kang SC, Liu YQ, et al. Microbial community structures in the Nam Co Lake, Tibetan Plateau, and comparison with other alpine lakes[J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2008, 30(6): 1041-1047 (in Chinese)
刘晓波, 康世昌, 刘勇勤, 等. 青藏高原纳木错湖细菌群落特征及其与高山湖泊的对比[J]. *冰川冻土*, 2008, 30(6): 1041-1047
- [8] Giorgi F, Hurrell JW, Marinucci MR, et al. Elevation dependency of the surface climate change signal: A model study[J]. *Journal of Climate*, 1997, 10(2): 288-296
- [9] Liu XD, Chen BD. Climatic warming in the Tibetan Plateau during recent decades[J]. *International Journal of Climatology*, 2000, 20(14): 1729-1742
- [10] Alfreider A, Pernthaler J, Amann R, et al. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(6): 2138-2144
- [11] Felip M, Camarero L, Catalan J. Temporal changes of microbial assemblages in the ice and snow cover of a high mountain lake[J]. *Limnology and Oceanography*, 1999, 44(4): 973-987
- [12] Hiorns W, Methé BA, Nierzeicki-Bauer SA, et al. Bacterial diversity in Adirondack mountain lakes as revealed by 16S rRNA gene sequences[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(7): 2957-2960
- [13] Marchetto A, Mosello R, Rogora M, et al. The chemical and biological response of two remote mountain lakes in the Southern Central Alps (Italy) to twenty years of changing physical and chemical climate[J]. *Journal of Limnology*, 2004, 63(1): 77-89
- [14] Callieri C, Pugnetti A, Manca M. Carbon partitioning in the food web of a high mountain lake: from bacteria to zooplankton[J]. *Journal of Limnology*, 1999, 58(2): 144-151
- [15] Pugnetti A, Bettinetti R. Biomass and species structure of the phytoplankton of an high mountain lake (Lake Paione Superiore, Central Alps, Italy)[J]. *Journal of Limnology*, 1999, 58(2): 127-130
- [16] Straškrabová V, Callieri C, Carrillo P, et al. Investigations on pelagic food webs in mountain lakes: aims and methods[J]. *Journal of Limnology*, 1999, 58(2): 77-87
- [17] Zwart G, Crump BC, Kamst-Van Agterveld MP, et al. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers[J]. *Aquatic Microbial Ecology*, 2002, 28: 141-155
- [18] Duan KQ, Yao TD, Wang NL, et al. The unstable holocene climatic change recorded in an ice core from the central Tibetan Plateau[J]. *Scientia Sinica Terrae*, 2012, 42(9): 1441-1449 (in Chinese)
段克勤, 姚檀栋, 王宁练, 等. 青藏高原中部全新世气候不稳定性的分辨率冰芯记录[J]. *中国科学: 地球科学*, 2012, 42(9): 1441-1449
- [19] Xu J, Kang SC. Aquatic ecology in Lake Nam Co, Tibetan Plateau: current awareness and perspective[J]. *Ecological Science*, 2010, 29(3): 298-305 (in Chinese)
徐军, 康世昌. 青藏高原湖泊纳木错水域生态学研究现状与展望[J]. *生态科学*, 2010, 29(3): 298-305
- [20] Yuan YL, Si GC, Wang J, et al. Bacterial community in alpine grasslands along an altitudinal gradient on the Tibetan Plateau[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2014, 87(1): 121-132
- [21] Zhou MY, Chen XL, Zhao HL, et al. Diversity of both the cultivable protease-producing bacteria and their extracellular proteases in the sediments of the South China Sea[J]. *Microbial Ecology*, 2009, 58 (3): 582-590
- [22] Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The bacterial glycocalyx in nature and disease[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1981, 35(1): 299-324
- [23] Dong XZ, Cai MY. *System Identification Manual of Common Bacteria*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 354-387 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. *常见细菌系统鉴定手册*[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 354-387
- [24] Buchanan, Gibbons. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*[M]. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984: 274-770 (in Chinese)
布坎南, 吉本斯. *伯杰氏细菌鉴定手册*[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984: 274-770
- [25] Zhong M, Wang LH, Ma H, et al. Effect of selenium-protein polysaccharide extracted from se-rich cordyceps militaris on tumor-bearing mice[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2008, 33(18): 2120-2123
- [26] Zimoch-Korzycka A, Bobak Ł, Jarmoluk A. Antimicrobial and

- antioxidant activity of chitosan/hydroxypropyl methylcellulose film-forming hydrosols hydrolyzed by cellulase[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(9): 1436
- [27] Kšonžeková P, Bystrický P, Vlčková S, et al. Exopolysaccharides of *Lactobacillus reuteri*: Their influence on adherence of *E. coli* to epithelial cells and inflammatory response[J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 141: 10-19
- [28] Gao YH, Gou CL, Wang YQ, et al. Isolation and identification of psychrophile from the lake and the properties of enzyme production[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(30): 273-277 (in Chinese)
高云航, 勾长龙, 王雨琼, 等. 湖水中低温菌的筛选及其产酶特性[J]. 中国农学通报, 2014, 30(30): 273-277
- [29] Peeters K, Hodgson D, Convey P, et al. Culturable diversity of heterotrophic bacteria in Forlidas Pond (Pensacola Mountains) and Lundström Lake (Shackleton Range), Antarctica[J]. Microbial Ecology, 2011, 62(2): 399-413
- [30] Zheng YK, Liu K, Xiong ZJ, et al. Effect of large-scale planting water hyacinth on cultivable bacterial community structure in the eutrophic lake[J]. Microbiology China, 2015, 42(1): 42-53 (in Chinese)
郑有坤, 刘凯, 熊子君, 等. 大水面放养水葫芦对富营养化湖泊水体可培养细菌群落结构的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 42-53
- [31] Zhou LH, Chen SC, Deng ZD, et al. Culturable bacteria in the sediment of Lake Taihu (I): primary analysis of bacterial diversity[J]. Journal of Lake Sciences, 2009, 21(1): 27-35 (in Chinese)
周丽华, 陈士超, 邓志端, 等. 太湖沉积物中的可培养细菌: I. 细菌多样性初步分析[J]. 湖泊科学, 2009, 21(1): 27-35
- [32] Liu W, Yang J, Wu G, et al. Diversity of cultivable bacteria based on different carbon sources in the sediments of lakes in northern Qinghai-Tibetan Plateau[J]. Journal of Salt Lake Research, 2016, 24(2): 92-101 (in Chinese)
刘文, 杨渐, 吴耿, 等. 青藏高原北部湖泊沉积物中基于不同碳源可培养细菌多样性[J]. 盐湖研究, 2016, 24(2): 92-101
- [33] Han YH, Zhang WX, Zhuang ZG, et al. Isolation and characterization of the salt-tolerant aerobic denitrifying bacterial strain A-13[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(1): 47-58 (in Chinese)
韩永和, 章文贤, 庄志刚, 等. 耐盐好氧反硝化菌 A-13 菌株的分离鉴定及其反硝化特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(1): 47-58