

黄河故道湿地可培养细菌多样性及产木聚糖酶菌株筛选

孟晓林¹, 黄建蓉¹, 明红², 郭倩倩¹, 聂国兴¹

(1. 河南师范大学水产学院, 河南新乡 453007; 2. 新乡医学院生命科学
技术学院合成生物学研究所, 河南新乡 453003)

摘要:研究黄河故道湿地可培养细菌的多样性及其产木聚糖酶的应用潜力. 采用稀释平板涂布法从湿地样品中获得 119 株菌株, 形态去重复后对 93 株进行 16S rRNA 基因系统发育分析以及利用刚果红染色法进行木聚糖酶活性筛选. 结果表明, 分离得到的菌株分属于 4 个门的 18 个科、21 个属, 其中优势类群为变形菌门(Proteobacteria)(41 株, 44%). 该地区可培养细菌的 Shannon-Wiener 多样性指数 $H' = 3.66$, Simpson 指数 $D = 0.97$; Margalef 物种丰富度指数 $d_{Mm} = 10.59$; Shannon 物种均匀度指数 $E = 0.94$, 且样点青龙湖多样性指数高于样点刘寨. 93 株代表性菌株的木聚糖酶筛选结果显示, 11.82% 具有木聚糖酶活性, 链霉菌和芽孢杆菌在木聚糖酶活性菌株中比例最高. 以上结果表明豫北黄河故道湿地蕴含丰富的细菌资源, 可为木聚糖酶的研发提供良好的菌种来源.

关键词:黄河故道湿地; 可培养细菌; 多样性; 木聚糖酶;

中图分类号: Q938.2

文献标志码: A

湿地是兼有水体和陆地双重特征的独特生态系统, 具有物质、能量交换和水质净化等生态服务功能, 是生物多样性最丰富的保护地^[1]. 在湿地生态系统中, 微生物被认为是评估湿地生物多样性的重要指标^[2], 因此对湿地微生物多样性的研究不仅有助于我们了解该环境中微生物资源的分布特征及其在湿地生态系统中的功能和作用, 也为后续开发和利用该类生物资源提供实验依据.

黄河故道湿地位于河南省封丘县的黄河洼地及滩涂范围内, 面积达 14 280 hm², 属温带大陆性季风气候^[3]. 该地区滩涂广阔, 野生动植物资源丰富, 是典型的内陆湿地. 目前已有研究者对乌梁素海湖滨湿地^[1]、剑湖湿地^[4]、肇庆星湖湿地^[5]等湿地微生物多样性开展了研究, 而对黄河故道湿地微生物多样性研究的报道甚少.

产酶是微生物在工业应用中的主要特性之一, 其中产木聚糖酶菌株受到研究者的青睐. 木聚糖酶属于水解酶类, 是一类可以将木聚糖降解成低聚木糖或木糖的复合酶系. 饲料工业方面, 木聚糖酶能降低小麦型日粮水溶性木聚糖导致的食糜黏性增高, 从而提高消化酶对底物的作用效率, 同时木聚糖酶可作用于不溶性非淀粉多糖, 破碎植物细胞壁, 并释放出营养物质^[6]. 此外, 木聚糖酶在食品工业^[7]、酿酒工业^[8]、造纸工业^[9]、能源转化、医药工业、纺织工业等行业中也有广泛应用. 湿地环境植物的叶片、枝干等是丰富纤维素和半纤维素资源, 长期在此环境中生存的微生物具有降解纤维素和半纤维素的能力, 产生相应水解酶类. 木聚糖是植物细胞中半纤维素的主要成分, 然而自然界中很大一部分木聚糖未被有效利用, 造成很大的资源浪费. 因此, 基于对黄河故道湿地可培养细菌多样性分析的基础之上, 筛选产木聚糖酶的功能菌将具有十分重要的意义.

近年来, 黄河故道湿地生态环境破坏严重, 面积日益萎缩, 亟待研究者们对其微生物资源多样性进行研究和保护. 黄河故道湿地青龙湖(湿地中心)和刘寨(湿地边缘)野生动植物资源丰富, 人为破坏少, 为代表性样点. 本文结合纯培养法和分子生物学方法来研究豫北黄河故道湿地土壤可培养细菌多样性及其产木聚糖

收稿日期: 2016-03-14

基金项目: 河南省高校科技创新团队支持计划(14IRTSTHN013); 河南省科技创新杰出青年支持计划(154100510009); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A240001).

第 1 作者简介: 孟晓林(1981-), 男, 山西榆社人, 河南师范大学副教授, 博士, 研究方向为资源微生物开发利用, E-mail: xuzhu288482@163.com.

通信作者: 聂国兴, 河南师范大学教授, 博士, E-mail: niegx@htu.cn.

酶菌株的潜力,为人们深入认识湿地功能和保护湿地微生物多样性打下初步的理论基础以及为后续功能酶菌株的开发利用提供良好的菌源。

1 材料与方 法

1.1 样品采集

样品于2014年7月采自黄河故道湿地青龙湖(湿地中心)和刘寨(湿地边缘)两处,采样方式为5点采样法。青龙湖样品地理位置为N 34°56'51.93",E 114°36'04.44",H 79 m。刘寨样品地理位置为N 34°57'14.26",E 114°35'47.76",H 82 m。采集的土样标记后放入无菌自封袋中,干冰运输回实验室,冰箱4℃保存待用。

1.2 培养基

1.2.1 分离培养基

1号培养基(g/L): birchwood xylan 0.3, (NH₄)₂SO₄ 2.0, KH₂PO₄ 0.2, Agar 20.0;

2号培养基(g/L): birchwood xylan 0.3, peptone 1.0, Yeast extract 1.0, NaCl 0.5, Agar 20.0;

3号MB培养基(g/L): NH₄Cl 1.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.3, KH₂PO₄ 0.3, Mg₂Cl·6H₂O 0.5, NaCl 2.0, KCl 0.2, CaCl₂ 0.05, Trace salt solution 9.0 mL, Cysteine·HCl 0.5, Yeast extract 1.0, Tryphone 2.0, Sol starch 10.0, NaHCO₃ 0.2, Agar 20.0;

4号腐植酸(HV)培养基(g/L)^[10]: Humic acid 1.0, Na₂HPO₄ 0.5, KCl 1.7, MgSO₄ 0.05, FeSO₄ 0.01, CaCO₃ 0.02, Multivitamin 0.02, Trace salt solution 1.0 mL, Agar 20.0;

5号Cl-Na-HCO₃型培养基(g/L): NaCl 0.6, NaHCO₃ 0.2, MgSO₄ 0.01, KCl 0.1, H₃BO₃ 0.05, NaF 0.05, Yeast extract 1.0, Tryphone 1.0, Trace salt solution 1.0 mL, Agar 20.0;

6号1/3查氏培养基(g/L): Sucrose 10.0, NaNO₃ 0.67, K₂HPO₄ 0.33, MgSO₄·7H₂O 0.17, KCl 0.17, FeSO₄ 0.003, Trace salt solution 1.0 mL; Agar 20.0;

7号GTY培养基(g/L)^[11]: Peptone 0.5, Yeast extract 0.2, CaCO₃ 1.0, Glucose 1.0, Agar 20.0;

8号1/3高氏培养基(g/L): Sol starch 6.67, KNO₃ 0.33, K₂HPO₄ 0.17, MgSO₄·7H₂O 0.17, NaCl 0.17, FeSO₄ 0.003, Agar 20.0;

9号改良PYG培养基(g/L): Tryphone 3.33, Soy peptone 1.67, Hydrolyzed milk protein 1.67, Glucose 3.33, Trace salt solution 1.0 mL, L-cysteine 0.17, Multivitamin 0.02, Agar 20.0;

1.2.2 纯化培养基

T5培养基(g/L): Glucose 1.0, Lotus root starch 1.0, Tryphone 0.5, Yeast extract 2.0, CaCO₃ 1.0, Agar 20.0;

38#培养基: Yeast extract 4.0, Malt extract powder 3.3, Glucose 4.0, Trace salt solution 1.0 mL, Multivitamin 0.02, Agar 20.0;

Trace salt solution(g/L): FeSO₄·7H₂O 0.1, MnCl₂·4H₂O 0.1, ZnSO₄·7H₂O 0.1;

以上培养基pH均调为7.2~7.4左右,1×10⁵ Pa灭菌30 min。

1.3 分离实验方法

1.3.1 样品处理

称取2g新鲜土壤样品放于装有18 mL无菌水和无菌玻璃珠的150 mL三角瓶中,37℃、180 r/min振荡1~2 h,制成样品悬浊液。

1.3.2 菌株分离与挑菌保藏

采用稀释平板涂布法,分别吸取150 μL稀释至10⁻⁴的样品稀释液均匀涂布于分离培养基上,于28℃恒温培养箱中倒置培养。7~10 d后挑取形态各异的单菌落接种于T5和38#培养基上,纯化3次后将最终所得的纯培养物分别用斜面(4℃)和含30%甘油的冻存管(-80℃)2种方式进行保藏。

1.4 基因组 DNA 提取及 16S rRNA 基因系统进化树的构建

基因组 DNA 的提取参照 Chelex 法^[12]. PCR 引物采用细菌与放线菌通用引物,正向引物 PA:5'-CA-GAGTTTGATCCTGGCT-3';反向引物 PB:5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'. PCR 反应体系:2xTaq MasterMix 10.0 μ L, PA 1.0 μ L, PB 1.0 μ L, D. D. Water 7.5 μ L, DNA Template 0.5 μ L. 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,55 $^{\circ}$ C 退火 40 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s,共 32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 产物送往上海英潍捷基贸易有限公司进行正向测序,用于系统发育多样性分析. 测序所得结果用 NCBI-Blast 程序和 EzTaxon server 2.1^[13]进行比对. 对于初步判断为新分类单元的菌株,对扩增出来的条带进行胶回收,连接转化后,克隆菌液交由上海生工生物工程有限公司进行测序,拼接后进行物种发育地位分析. 以同源性较高的典型菌株作为参比对象,利用 CLUSTAL X 软件^[14]进行比对. 采用 MEGA 6.0 (Molecular evolutionary genetics analysis) 软件包的邻接法 (Neighbor-Joining method)^[15]构建基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树. 重复抽样次数为 1000 次.

1.5 多样性分析

1.5.1 香农指数对多样性进行分析

定义 16S rRNA 基因序列相似性 $\leq 97\%$ 作为不同的分类单元^[16]. 按照下式计算样本的

Shannon-Wiener 多样性指数^[17]: $H' = - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i$;

Simpson 物种多样性指数: $D = 1 - \sum_{i=1}^s P_i \ln P_i^2$;

Margalef 物种丰富度指数: $d_{Ma} = \frac{S-1}{\ln N}$;

Shannon 物种均匀度指数: $E = \frac{H'}{\ln S}$;

式中, P_i 为属于种 i 的个体在全部个体中的比例; $P_i = n_i/N$; n_i 是第 i 种的菌株数; N 是所有菌株数的总和; S 为群落中所有物种数目.

1.5.2 统计不同培养基分离到的细菌多样性

统计不同培养基分离到的细菌的种类与数量.

1.6 木聚糖酶活性评价

产木聚糖酶菌株筛选采用刚果红染色法. 将纯化后的菌体接种到含有底物的改良 ISP 4 琼脂培养基中, 28 $^{\circ}$ C 倒置培养 7 d 后, 倒入 0.5% 刚果红染色液至淹没平板表面, 染色 30~60 min 后, 倒掉染色液, 加入 1 mol/L NaCl 溶液脱色 30 min. 测量并记录菌落直径和透明圈直径距离, 计算透明圈与菌落直径的比值.

改良 ISP 4 培养基 (g/L): birchwood xylan 10 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4$ 1 g, NaCl 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g, $CaCO_3$ 1 g, Trace salt solution 1.0 mL, Agar 15.0 g, pH 7.0~7.2.

2 结 果

2.1 类群多样性

根据菌落形态、颜色、大小、湿润度等特征, 最终从本次采集样品中分离的 119 株纯培养物选取 93 株代表性菌株, 用正向引物 PA 测定 16S rRNA 基因前段序列, 根据峰图, 选取 550 bp 左右序列用于系统发育多样性分析. 对测序的 93 株菌株进行 16S rRNA 基因序列的相似性分析, 结果表明: 该地区 93 株代表性细菌共分布于 4 个门一级的分类单元 (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria) 的 18 个科 (Microbacteriaceae, Streptomycetaceae, Flavobacteriaceae, Chitinophagaceae, Bacillaceae, Paenibacillaceae, Planococcaceae, Sporolactobacillaceae, Erythrobacteraceae, Rhizobiaceae, Rhodobacteraceae, Comamonadaceae, Lautropia-f, Neisseriaceae, Zoogloea-f, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae, Xanthomonadaceae)、21 个属 (Microbacterium, Streptomyces, Chryseobacterium, Flaviumibacter, Bacillus, Paenibacillus, Brevibacillus, Lysinibacillus, Fictibacillus, Porphyrobacter, Ciceribacter, Rhizobium, Gemmobacter, Comamonas,

Limnobacter, Vogesella, Thauera, Acinetobacter, Azotobacter, Pseudomonas, Luteimonas) (图 1a). 其中变形菌门(Proteobacteria)为优势类群,分离到 12 个属级类群的 41 株菌,占已测序的 44%. 其次是厚壁菌门(Firmicutes),分离到 5 个属级类群的 37 株菌,占已测序的 40%. 少数分布于放线菌门和拟杆菌门,分别占已测序的 13.0%和 3.0%(图 1b).

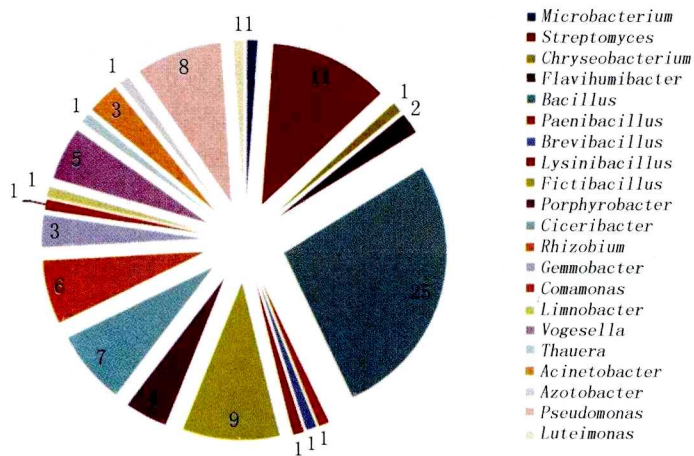


图 1a 黄河故道湿地可培养细菌在属间的分布

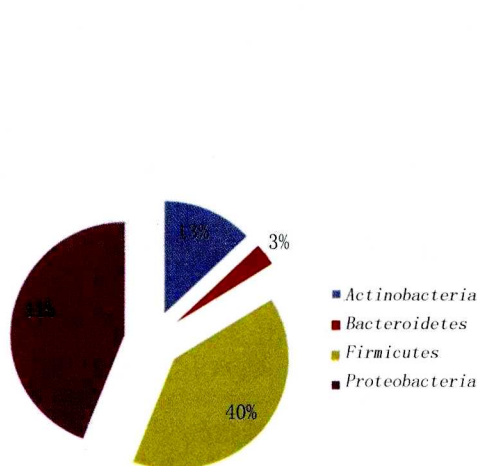


图 1b 黄河故道湿地可培养细菌在属间的分布

2.2 物种多样性和遗传多样性

按 16S rRNA 基因序列相似性大于 97% 的菌株归于同一物种计,93 株分离菌株可以归为 49 个物种(图 1a). 除 36 株与有效发表种典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 100% 以外,其余 57 株分离菌株与有效发表种的典型菌株的序列相似性在 95.75%~99.82% 之间,说明大部分菌株与其系统发育关系最密切的相关典型菌株之间存在较大的遗传差异. 值得指出的是,菌株 CFH D32 与其系统发育关系最密切的典型菌株的 16S rRNA 基因序列存在着较大的差异,可能为新的分类单元(Potential new taxa). 进一步连接转化拼接获得其 16S rRNA 基因全序列(Genbank 登录号:KT892946),并构建系统进化树(见图 2). 结果表明,菌株 CFH D32 的 16S rRNA 基因与同源性最高的典型菌株(*Flaviumibacter cheonanensis* WS16^T) 差异较大,相似度为 97.19%,且在系统进化上形成独立的亚分支(图 2),极有可能代表 *Flaviumibacter* 属的一个新种. 此菌株最终的分类地位,需要结合生理生化、细胞理化性质以及与系统发育最密切的菌株做多相分类鉴定以确定.

2.3 可培养细菌多样性

该地区分离出的可培养细菌 Shannon-Wiener 多样性指数 $H=3.66$; Simpson 指数 $D=0.97$; Margalef 物种丰富度指数 $d_{Mk}=10.59$; Shannon 物种均匀度指数 $E=0.94$. 两个采样点的香农指数和辛普森指数如表 1 所示. 从表 1 可知,采样点青龙湖的可培养细菌多样性指数高于采样点刘寨.

表 1 两个样点可培养细菌多样性指数

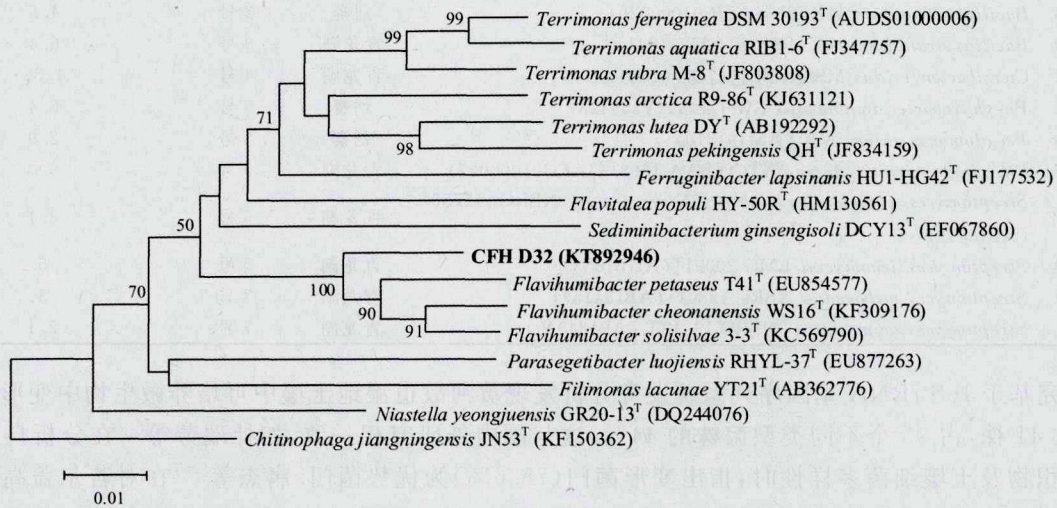
采样点	Shannon-Wiener 多样性指数 (H)	Simpson 指数 (D)
青龙湖	3.45	0.96
刘寨	2.87	0.93

2.4 不同分离培养基获得的可培养细菌多样性比较

从图 3 可以看出,以 5 号 Cl-Na-HCO₃ 型培养基分离数量最多,占总分离总数的 24%;而 4 号腐植酸(HV)培养基和 8 号 1/3 高氏培养基的分离数量较少,分别占总菌株数的 2%和 3%. 从多样性角度,5 号和 6 号分离培养基共分离得到 10 个属,9 号和 8 号分别分离得到 9 个和 8 个属,分离效果较好,而 4 号和 8 号培养基则只分离得到 2 个属和 3 个属,分离效果较差.

2.6 菌株木聚糖酶活性评价

对分离得到的93株代表菌株进行木聚糖酶活性筛选,具有木聚糖酶活性的菌株共11株,占筛选菌株的11.82%。其中链霉菌4株,芽孢杆菌3株,*Ciceribacter* 1株,紫杆菌1株,假单胞菌1株,根瘤菌1株,见表2。在木聚糖酶活性的菌株中链霉菌所占的比例最大,为36.36%,其次为芽孢杆菌,所占的比例为27.27%,*Ciceribacter*、紫杆菌、假单胞菌、根瘤菌,所占的比例均为9.09%,所占比例较少。



注:分支点上的数字是基于邻接法分析1000次的自举值(Bootstrap valus),图中只显示高于50%的;标尺表示每100个碱基位点1个变异。

图2 豫北黄河故道湿地潜在新类群的系统发育树

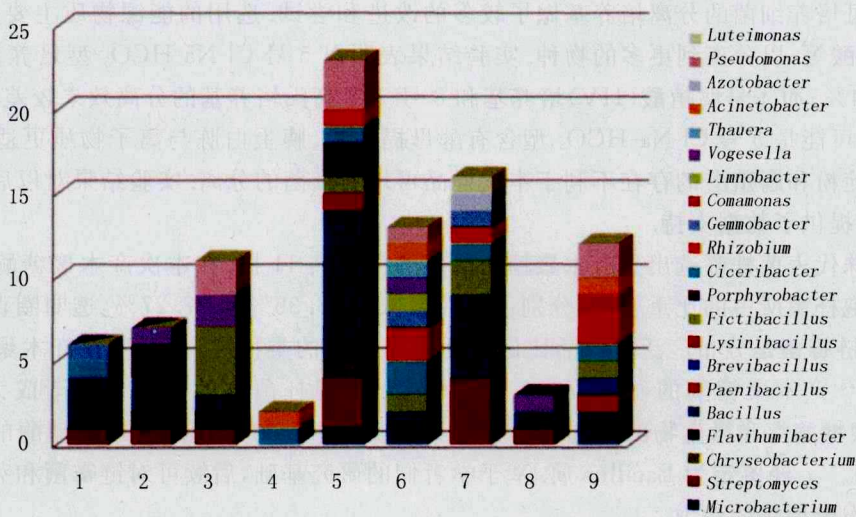


图3 不同分离培养基获得的可培养细菌多样性比较

3 讨论

黄河故道湿地位于封丘县的黄河背河洼地及滩涂范围内,地势平坦。湿地属暖温带大陆性季风气候区,年平均气温 14.1℃,7月份平均气温 27.8℃,年均降雨量 604 mm^[3]。植物区系组成有 68 科 273 属 745 种,包含众多水生植被和陆生植物。动物资源有 156 种鸟类、12 种兽类、9 种爬行类、32 种鱼类等。湿地丰富的生物多样性给微生物提供了充足的资源。本文采用纯培养与 16S rRNA 基因序列系统发育分析相结合的方法,对黄河故道湿地可培养细菌的多样性及其产木聚糖酶潜力的菌株进行了初步研究。用于系统发育分析的

93株代表性菌株归属于4个门、18个科、21个属,可分为49个物种,且大部分分离到的菌株与其系统发育关系最密切的有效发表典型菌株之间的16S rRNA基因序列存在一定的差异,其中CFH D32菌株为潜在的新分类单元(Potential new taxa).这些结果揭示了黄河故道湿地样品中存在较为丰富的细菌多样性.

表2 木聚糖酶活性筛选结果

菌株编号	最相近菌种	分离地点	分离培养基	透明圈与菌落直径比值
CFH D10	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K ^T (AJ831844)	刘寨	7号	3.8
CFH D63	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b ^T (ASJC01000029)	刘寨	2号	4.5
CFH D79	<i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a ^T (AJ831841)	青龙湖	9号	6.4
CFH D21	<i>Ciceribacter lividus</i> MSSRFBL1 ^T (JQ230000)	青龙湖	4号	1.83
CFH D71	<i>Porphyrobacter donghaensis</i> SW-132 ^T (AY559428)	刘寨	5号	6.4
CFH D116	<i>Pseudomonas guinea</i> M8 ^T (AM491810)	刘寨	5号	2.9
CFH D86	<i>Rhizobium selenitireducens</i> ATCC BAA-1503 ^T (JAEG01000027)	青龙湖	9号	3.0
CFH D102	<i>Streptomyces cinereoruber</i> subsp. <i>Cinereoruber</i> NBRC 12756 ^T (AB184121)	青龙湖	5号	3.1
CFH D14	<i>Streptomyces lienomycini</i> LMG 20091 ^T (AJ781353)	青龙湖	5号	5
CFH D41	<i>Streptomyces narbonensis</i> NBRC 12801 ^T (AB184157)	青龙湖	7号	3
CFH D9	<i>Streptomyces zaomyceticus</i> NBRC 13348 ^T (AB184346)	青龙湖	7号	2.1

本研究基于16S rRNA基因序列系统发育分析发现黄河故道湿地土壤中可培养微生物中变形菌门为主要类群,共41株,占93个不同类型菌株的44%.这与国内外研究相一致,如杜瑞芳等^[1]在分析乌梁素海湖滨湿地沉积物及土壤细菌多样性时,指出变形菌门(78.6%)为优势菌门.唐杰等^[20]在对若尔盖高原湿地土壤中细菌群落结构和多样性研究发现,变形菌为优势菌群.Ahn等^[21]在对湿地沉积物中的细菌群落进行研究,发现有60%的细菌种类属于变形菌.

通过计算得知,采样点青龙湖的香农指数为3.45,高于采样点刘寨的2.87,说明青龙湖样点可培养细菌多样性较高,种类比较丰富.分析原因可能为采样地点具有特殊性.采样点青龙湖(湿地中心)相对于刘寨(湿地边缘)人为破坏少,野生动植物资源丰富加上鸟类和气候的影响使得青龙湖样点蕴含了丰富的微生物资源.本次试验针对可培养细菌的分离培养基做了较多的改进和尝试.选用的能源物质主要是Yeast extract、木聚糖、淀粉、腐殖酸等,以分离到更多的物种.实验结果表明以5号Cl-Na-HCO₃型培养基分离效果较好,占总分离总数的24%;而4号腐植酸(HV)培养基和8号1/3高氏培养基的分离效果较差,分别占总菌株数的2%和3%.原因可能是5号Cl-Na-HCO₃型含有酵母提取物、胰蛋白胨与离子物质更适合广谱细菌的生长,而较高含量的淀粉和腐殖酸的存在不利于本次样品可培养细菌的分离.实验结果对以后选用分离培养基来分离可培养细菌提供了数据支持.

本实验从93株代表菌株筛选出具有木聚糖酶活性的菌株共11株.在本次产木聚糖酶活性菌株筛选实验中,链霉菌和芽孢杆菌所占的比重较大,分别占活性菌株的36.36%和27.27%,透明圈直径与菌落直径比值可达3.0~6.4.链霉菌是分布广泛且酶活比例及活性均较高的类群之一,目前在产木聚糖酶活性菌株的筛选中,链霉菌^[22-23]产木聚糖酶的研究较为广泛.另外对芽孢杆菌属的研究也逐渐成为热点,如黄小云等^[24]在进行产木聚糖酶海洋微生物的筛选与诱变育种的实验中获得一株高产木聚糖酶的菌株B659,酶活力为525.3 U·mL⁻¹,经鉴定为Bacillus属.基于学者们的研究基础,后续可对链霉菌和芽孢杆菌进行酶活实验,探究菌株产木聚糖酶的潜力.

原核生物的16S rRNA基因大小约1500 bp,包含较丰富的进化信息量,适用于多样性和系统发育分析,方便各级分类单元分级^[25].然而随着研究的深入,16S rRNA基因多拷贝数及其异质性特征等因素极可能导致不同类群原核生物的系统发育关系产生偏差^[26].本文通过16S rRNA基因序列分析方法得到单向结果,编号CFH D30,CFH D96,CFH D52的菌株与其系统发育关系最密切的已知物种的典型菌株的相似度均小于98%,但连接转化拼接之后得到16S rRNA基因全长序列其相似度大于98%,系统发育树上未形成独立分支.出现此现象的原因可能是将测序菌株的16S rRNA基因的测序结果进行比对时,选择的550 bp测序片段两端会存在一定比例错误测序的概率,导致最后的结果并不是特别准确.因此,如果想对具体菌株进行深入研究,而需要进一步完善16S rRNA基因序列分析方法,同时仍需设计合适的分离培养基,提高分离效

率,以发掘黄河故道湿地更多的微生物种质资源。

本实验从纯培养的角度出发,尝试用不同能源的分离培养基进行样品分离,获得大量的可培养细菌,充分表明黄河故道湿地蕴含丰富的微生物资源,为饲用酶制剂等功能性化合物的研发提供了良好的菌种来源。

参 考 文 献

- [1] 杜瑞芳,李靖宇,赵吉. 乌梁素海湖滨湿地细菌群落结构多样性[J]. 微生物学报,2014(10):003-006.
- [2] Sims A, Zhang Y, Gajaraj S, et al. Toward the development of microbial indicators for wetland assessment[J]. Water Res, 2013, 47(5): 1711-1725.
- [3] 牛红星,卜艳珍,路纪琪,等. 豫北黄河故道湿地鸟类自然保护区鸟类区系调查[J]. 生物多样性,2001,9(3):260-264.
- [4] 刘绍雄,王明月,王娟,等. 基于PCR-DGGE技术的剑湖湿地湖滨带土壤微生物群落结构多样性分析[J]. 农业环境科学学报,2013,32(7):1405-1412.
- [5] 薛冬,赵国振,姚青,等. 肇庆星湖湿地可培养放线菌多样性[J]. 微生物学报,2015,55(11):1485-1494.
- [6] 聂国兴,王俊丽,明红. 木聚糖酶的应用现状与研发热点[J]. 工业微生物,2008,38(1):53-59.
- [7] Romanowska I, Polak J, Bielecki S. Isolation and properties of *Aspergillus niger* IBT-90 xylanase for bakery[J]. Appl Microbiol Biot, 2006, 69(6):665-671.
- [8] Li Y, Lu J, Gu G, et al. Studies on water-extractable arabinoxylans during malting and brewing[J]. Food Chem, 2005, 93(1):33-38.
- [9] Ziaie-Shirkolaei Y, Talebizadeh A, Soltanali S. Comparative study on application of *T. lanuginosus* SSBP xylanase and commercial xylanase on biobleaching of non wood pulps[J]. Bioresour Technol, 2008, 99(16):7433-7437.
- [10] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes[J]. J Ferment Technol, 1987, 65(5):501-509.
- [11] Tang S K, Wang Y, Lee J C, et al. *Georgenia halophila* sp. nov., a halophilic actinobacterium isolated from a salt lake[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(6):1317-1421.
- [12] 刘冰冰,唐蜀昆,明红,等. 新疆罗布泊地区可培养嗜盐古菌多样性及其功能酶筛选[J]. 微生物学报,2011,51(9):1222-1231.
- [13] Chun J, Lee J H, Jung Y, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(10):2259-2261.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24):4876-4882.
- [15] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30: 2725-2729.
- [16] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44(4):846-849.
- [17] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, et al. Using ecological diversity measures with bacterial communities[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2003, 43(1):1-11.
- [18] 刘荷,朱泓溢,肖建青,等. 南海涠洲岛潮汐带栉江珧可培养细菌的系统发育多样性[J]. 微生物学通报,2014,41(11):2216-2226.
- [19] Woese C R, Kandler O, Wheelis M L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya[J]. Proc Natl Acad Sci, 1990, 87(12):4576-4579.
- [20] 唐杰,徐青锐,王立明,等. 若尔盖高原湿地不同退化阶段的土壤细菌群落多样性[J]. 微生物学通报,2011,38(5):677-686.
- [21] Ahn C, Gillevet P M, Sikaroodi M. Molecular characterization of microbial communities in treatment microcosm wetlands as influenced by macrophytes and phosphorus loading[J]. Ecol Indic, 2007, 7(4):852-863.
- [22] Zhou J, Shi P, Zhang R, et al. Symbiotic *Streptomyces* sp. TN119 GH 11 xylanase: a new pH stable, protease and SDS resistant xylanase[J]. J Ind Microbiol Biot, 2011, 38(4):523-530.
- [23] Simkhada J R, Yoo H Y, Choi Y H, et al. An extremely alkaline novel xylanase from a newly isolated *Streptomyces* strain cultivated in corn cob medium[J]. Appl Biochem Biotech, 2012, 168(7):2017-2027.
- [24] 黄小云,林娟,林小洪,等. 产木聚糖酶海洋微生物的筛选与诱变育种[J]. 福州大学学报(自然科学版),2015,43(5):715-721.
- [25] McCarthy C M, Murray L. Viability and metabolic features of bacteria indigenous to a contaminated deep aquifer[J]. Microb Ecol, 1996, 32(3):305-321.
- [26] Sun D L, Jiang X, Wu Q L, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Appl Environ Microb, 2013, 79(19):5962-5969.

Multi-stage and Multi-object Optimization Model for Money Laundering Network Path and Its Arithmetic Study

ZHANG Yan^a, XUE Yaowen^b

(a. School of Mathematics and Computer Science; b. School of Economic and Management, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China)

Abstract: In view of the multi-stage laundering money transfer path optimization decision problems, this paper proposes a multi-stage dynamic path planning model with the maximized amount of money-laundering and minimized risk as the decision-making goal on the condition of time pressure. Furthermore, this paper also puts forward an algorithm of solving the model by using the theory of multiple dynamic programming method and the maximum flow algorithm. Finally, the feasibility of the arithmetic has been proved by an example of the algorithm. This model can not only find the characteristic of money laundering behavior from laundering money transfer path, but also discover and track money laundering trails and the entire process, contributing to monitoring effectively all aspects of the money laundering process and reducing the cost of money laundering detection.

Keywords: multi-stage; multi-object; money laundering path; model; arithmetic

(上接第 139 页)

Diversity and Screening of Culturable Bacteria with Xylanase in Old Yellow River Course Wetland

MENG Xiaolin¹, HUANG Jianrong¹, MING Hong², GUO Qianqian¹, NIE Guoxing¹

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2. Institute of Synthetic Biology, Department of Life Science, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: To investigate the diversity of soil culturable bacteria of the Old Yellow River Course wetland and exploring their xylanase producing activity. Total 119 strains were isolated by using conventional culture-dependent method. After dereplication and removing the similar strains, phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences comparisons were further performed. The results showed that the 93 isolates belong to 21 genera of 18 families in 4 phylogenetic groups. The most abundant and diverse isolates was the phylum *Proteobacteria* (41 strains, 44%). The diversity indices of this region including Shannon-Wiener index (H'), the Simpson index (D), the Shannon evenness index (E) and the Margalef index (dMa) were 3.66, 0.968, 10.589 and 0.941 respectively, and the diversity indices of site Qinglong Lake were higher than site Liuzhai. Xylanase screening results showed that the positive rate about 11.82% in 93 strains. The abundant genus were *Streptomyces* and *Bacillus*. This experimental results showed that there were abundant bacterial species diversity and phylogenetic diversity in the Old Yellow River Course wetland. Meanwhile, these strains exhibited stronger activity of xylanase, which could provide the high-quality experimental for the research and development of functional compounds.

Keywords: Old Yellow River Course wetland; culturable bacteria; phylogenetic analysis; biodiversity; xylanase