

1 株来自陕西盐湖的极端嗜盐古菌的分离及鉴定*

赵萍 邹正中 王革娇**

(华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室,武汉 430070)

摘要 从陕西榆林苟池盐湖水中分离到1株嗜盐古菌 GS1 并对其进行了系统鉴定。通过形态鉴定、革兰氏染色、生长盐浓度试验、 Mg^{2+} 浓度试验、生长 pH 范围、生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列等分析,确认该菌为1株新型的极端嗜盐古菌,属于盐红菌属(*Halorubrum*)。GS1 与 *Halorubrum saccharovororum* (U17346) 的16S rRNA 基因序列同源性为97%。命名为 *Halorubrum* sp. GS1。其16S rRNA 基因序列已被 GenBank 数据库收录,序列号为 FJ793266。

关键词 极端嗜盐古菌; 盐红菌属; 盐湖; 陕西省; 16S rRNA 基因

中图法分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2009)05-0573-04

嗜盐古菌是生存于含盐环境下的、不同于嗜盐细菌的原核生物,主要分布于天然或人工高盐环境中,比如盐(碱)湖、晒盐场、含盐浓度高的土壤,以及一些腌制品中^[1]。嗜盐古菌是盐湖生态系统重要的组成之一,它们适应了高盐环境,可以分解利用多种有机物,参与湖中多种物质的循环与能量的传递^[2]。

我国是个多盐湖的国家,天然高盐环境资源丰富,由西往东的新疆、青海、西藏、甘肃、内蒙、陕西、山西、宁夏、河北、黑龙江、吉林、辽宁等地均有盐湖^[3]。我国的地域、气候、盐湖形成条件以及人类活动的影响导致了特定区域的盐湖含有特定的微生物区系。目前我国对盐湖嗜盐古菌的研究主要分布于青藏、新疆、内蒙古等地,对于位于我国盐湖区域南端的东部分散盐湖区的嗜盐微生物资源也有一定研究^[1-2,4-5]。通过可培养的方法,在这些地区的盐湖分离到了包括 *Natrinema*, *Natrialba*, *Natronococcus*, *Natronorubrum*, *Haloarcula*, *Halobacterium*, *Halorubrum*, *Haloterrigena*, *Halorhabdus*, *Halobiforma*, *Haloferax* 等极端嗜盐菌属的菌株。笔者所在实验室用非培养法在东部盐湖区的连云港和盐城地区鉴定到了嗜盐古菌 *Halobacterium*, *Haloplanus*, *Natronobacterium*, *Halogeometricum* 和 *Haloarcula* 5 个属^[6]。

陕西省榆林市定边地区苟池盐湖属于西北盐湖

区的内蒙古东部盐湖亚区的碳酸盐型盐湖^[7],为盐碱湖类,该省盐湖中的嗜盐古菌目前还未见报道。本研究自该地区盐湖水中分离纯化了1株嗜盐古菌 GS1,对其进行了形态学观察、生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列和系统发育学分析。

1 材料与方法

1.1 样品采集与菌株分离

2006年10月,采集陕西榆林盐湖的湖水及湖边土壤样品,装于聚乙烯袋中,4℃保存。取10g土样于装有40mL无菌5%NaCl溶液的三角瓶中,置于37℃,180r/min摇床中振荡1h,静置一段时间后取上清液按 $10^{-2} \sim 10^{-5}$ 梯度稀释涂布平板。盐湖水中直接涂布含高盐培养基的平板(NaCl 250g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20g, 柠檬酸钠 3g, KCl 2g, $CaCl_2 \cdot 0.2g$, 细菌蛋白胨 10g, 加蒸馏水至1L。调节pH值到7.0,固体培养基加琼脂20g)。平板置于37℃温箱内培养7~10d,挑取单菌落,反复划线纯化至获得纯菌。

1.2 形态观察与革兰氏染色

形态学观察及生理生化鉴定所用培养基为ATCC No. 2185:NaCl 250g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20g, 柠檬酸三钠 3g, KCl 2g, 胰蛋白胨 5g, 酵母提取物 3g, 0.1mL 过滤灭菌的微量元素溶液[每200mL

收稿日期:2009-04-09; 修回日期:2009-07-08

*国家自然科学基金项目(30671140)和教育部博士点基金项目(20060504027)资助

** 通讯作者。E-mail: gejiao@mail.hzau.edu.cn

赵萍,女,1984年生,华中农业大学生命科学技术学院硕士研究生,武汉430070。E-mail: 86365269@163.com

含: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.32 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.34 g, $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.78 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.14 g]加蒸馏水至 1 L。调节 pH 值到 7.0, 固体培养基加琼脂 20 g。在 ATCC No. 2185 平板培养基上划线, 37 °C 静置培养 7 d, 观察单菌落形态特征。

用灭菌牙签沾取培养了 3 d 的 ATCC 平板上的菌落, 在滴加于干净载玻片之上的 10 μL 盐溶液中打散。空气中干燥后, 置于 2% 的冰乙酸溶液中固定脱盐 5 min, 移出自然干燥后采取标准革兰氏染色步骤。光学显微镜下观察细菌细胞颜色、形状并测定其大小。

1.3 生理生化鉴定

生理生化鉴定方法参照文献[8-10]描述的嗜盐菌新分类单位描述的最低标准中的方法。

1.4 生长条件试验

1) 生长盐浓度试验。用含不同浓度 NaCl 的液体 ATCC No. 2185 培养基对菌株耐盐性及最适生长盐浓度进行测定。NaCl 浓度为 0.0 ~ 5.2 mol/L, 每 0.5 mol/L 1 个梯度。1% 接种量分别接种, 置于 37 °C, 180 r/min 摇床中振荡培养 5 d, 取菌液用分光光度法测定细胞密度(用 $A_{600\text{nm}}$ 表示)。

2) 最适 pH 值试验。添加缓冲剂(K_2HPO_4 , 柠檬酸, NaOH, 硼酸)改变液体 ATCC No. 2185 培养基的 pH 值, pH 值范围为 5.0 ~ 9.0, 每隔 0.5 pH 1 个梯度。菌培养和测定方法同生长盐浓度试验。

3) 最适 Mg^{2+} 浓度试验。改变液体 ATCC No. 2185 培养基中 MgSO_4 浓度, 分别为 0、20、50、80、100、150 mmol/L。菌培养和测定方法同生长盐浓度试验。

1.5 16S rRNA 基因的测序及系统发育学分析

1) 菌株 GS1 基因组总 DNA 的提取。接种 GS1 于液体 ATCC No. 2185 培养基中, 37 °C, 180 r/min 培养 3 d。取菌液于 12 000 r/min, 4 °C 下离心 10 min, 弃上清, 用 1 mL 盐溶液(每升含: NaCl 250 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 g, 柠檬酸三钠 3 g, KCl 2 g)重悬沉淀。加入 1 mL 无菌双蒸水于重悬沉淀的溶液中, 置于室温下裂解细胞。至裂解液呈粘稠状时, 用饱和酚氯仿溶液抽提 2 次。用预冷的无水乙醇沉淀 DNA, 70% 乙醇洗涤 2 次, DNA 沉淀自然晾干后加入无菌双蒸水溶解。

2) 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与鉴定。采用古菌简并引物 27F(5'-TCCGGTTGATCCTGCCG-

GA G 3'), 1540R(5'-AGGAGGTGATCCA GCCG-CAG 3')^[4], 取 DNA 溶液 2 μL 为模板扩增 GS1 16S rRNA 基因。PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s; 50 °C 45 s; 72 °C 1 min; 30 个循环; 72 °C 10 min。使用赛百盛试剂盒纯化 PCR 产物, 由北京三博远志公司完成测序工作。

3) 系统发育树的构建。将所测定的 16S rRNA 基因序列利用 Blast 软件在 GenBank 数据库中进行相似性搜索, 选取同源性较高的典型嗜盐古菌菌株的 16S rRNA 基因序列作为参比对象, 再用 CLUSTAL X 1.83 软件进行多序列匹配排列, 比对并计算供试菌株与参比菌株之间的序列相似性, 通过 MEGA3.1 软件构建供试菌与参比菌之间的系统发育树。用邻位相连法(Neighbor-joining)的算法构建进化树, 用 Bootstrap 做验证的进化树分析, 模式选取为 p-distance, 随机种子数设为 500。

2 结果与分析

2.1 形态特征和革兰氏染色

菌落于平板上培养至 7 d 时呈圆形, 橘红色, 表面光滑湿润, 有黏性, 边缘较整齐, 菌落直径约为 1.5 mm。GS1 为革兰氏阴性菌, 细胞在光学显微镜下呈球体形态, 大小约为 1 ~ 2 μm (图 1)。

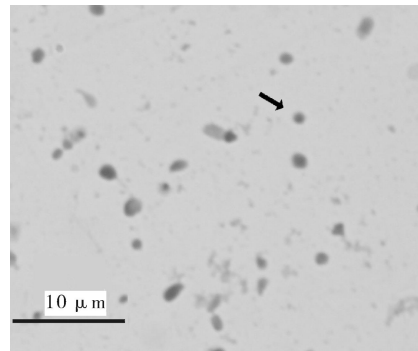


图 1 GS1 菌革兰氏染色的光学显微镜照片

Fig. 1 A light micrograph of Gram staining results of strain GS1

箭头所指为 GS1 菌体细胞 The arrow points to a cell of strain GS1

2.2 生理生化特征

参照文献[11-13], 对菌株 GS1 进行生理生化特性鉴定, 该菌株表现为: 不水解淀粉, 不液化明胶, 不生成 H_2S , 不水解吐温 80, 吲哚实验阴性, 过氧化氢酶阳性, 硝酸盐还原实验阳性。GS1 能利用蔗糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖作为唯一碳源生长, 不能利用甘露醇(表 1)。

表 1 GS1 与盐红菌属 (Halorubrum) 几个典型种的比较¹⁾

Table 1 Comparisons of important features of strain GS1 and some members of genus Halorubrum

特征 Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
颜色 Color	橘红 Orange	橘红 Orange	ND	橘红 Orange	橘红 Orange	红色 Red	橘红 Orange
生长盐浓度范围/ (mol · L ⁻¹) NaCl range for growth/ (mol · L ⁻¹)	2.5 ~ 5.2	1.5 ~ 5.2	1.8 ~ 5.2	2.0 ~ 5.2	1.7 ~ 5.2	1.5 ~ 5.2	0.5 ~ 4.3
生长是否需要镁离子 Mg ²⁺ required	+	+	-	+	ND	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	-	+	ND	+	W	W
吲哚产生 Indole formation	-	-	+	ND	-	-	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	-	-	ND	ND	-	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	-	-	ND	-	+	-
吐温水解 Tween hydrolysis	-	-	-	ND	-	-	ND
H ₂ S 产气实验 H ₂ S formation	+	+	+	ND	ND	-	ND
蔗糖 Sucrose	+	+	-	ND	+	-	+
果糖 Fructose	+	+	+	ND	-	ND	+
唯一碳源 Utilization of carbon source	半乳糖 Galactose	+	-	+	ND	-	-
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	-	-	+
甘露醇 Mannite	-	+	ND	ND	-	+	-
麦芽糖 Maltose	+	+	+	ND	ND	ND	+
乳糖 Lactose	+	+	-	+	ND	-	+

1) 1. Strain GS1; 2. *H. saccharovorum* JCM 8865^T; 3. *H. alkaliphilum* DZ-1^T; 4. *H. coriense* JCM 9275^T; 5. *H. distributum* JCM 9100^T; 6. *H. lacusprofundi* JCM 8891^T; 7. *H. sodomense* ATCC 33755^T; + :阳性 Positive; - :阴性 Negative; W:轻度阳性 Weakly positive; ND:无数据 Not determined

2.3 生长条件

GS1 的生长盐浓度范围为 2.5 ~ 5.2 mol/L, 最适盐浓度为 4.0 mol/L。生长 pH 范围为 6.5 ~ 8.0, 最适 pH 为 7.5, 最适 Mg²⁺ 浓度为 50 mmol/L。

2.4 GS1 16S rRNA 基因序列的相似性比较及系统发育树分析

各菌株以 16S rRNA 基因序列为基础的系统发

育树见图 2, 从图 2 可以看出: 菌株 GS1 属于盐红菌属, 与 *Halorubrum saccharovorum*, *H. lipolyticum*, *H. aidingense*, *H. alkaliphilum*, *H. californiense*, *H. distributum* 序列同源性依次为 97%、96%、95%、94%、93%、93%。

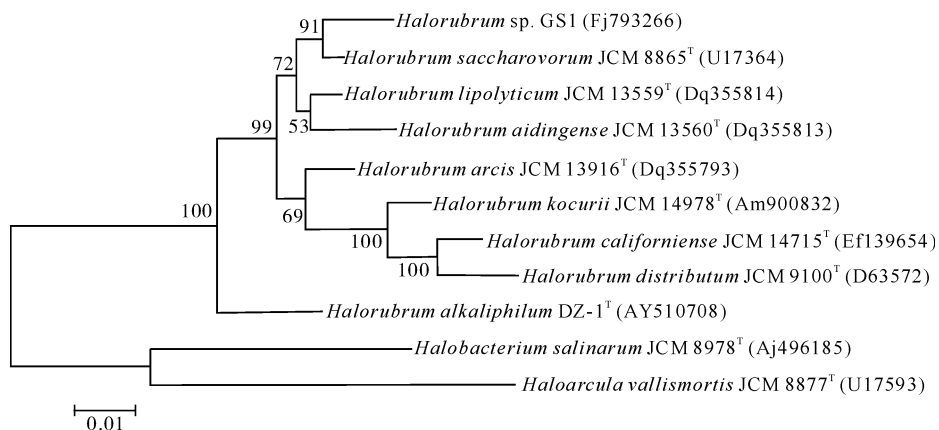


图 2 根据 16S rRNA 基因序列构建的 GS1 菌与极端嗜盐菌系统发育树

Fig. 2 A 16S rRNA gene phylogenetic tree of strain GS1 and other extremely halophilic archaea

3 讨论

试验结果表明, GS1 菌株符合盐红菌属的特征, 即为革兰氏阴性菌, 在蒸馏水中细胞会破裂, 菌

落呈橘红色, 生长盐浓度范围为 2.5 ~ 5.2 mol/L, 最适盐浓度为 4.0 mol/L, 最适 Mg²⁺ 浓度为 50 mmol/L, 最适 pH 为 7.5。经与该属的 11 个种比较, GS1 的生理生化特征符合盐红菌属, 但与其它

种有一定差异。参考 GS1 和其它种的最高 16S rRNA 基因序列同源率为 97%，可以确认为属于嗜盐菌属的 1 个新种，命名为 *Halorubrum* sp. GS1。

嗜盐古菌类群作为盐湖微生物的重要组成部分，可以消耗大量的悬浮有机物，参与盐湖生态系统的物质循环与能量传递。陕西省榆林市定边地区是陕西唯一的原盐生产地，共有大小盐湖 14 个，盐田 227 hm²。对其开采已有上千年历史，苟池盐湖属于封闭性盐湖，水量只有靠降雨补给，随着人口增加、生产事业发展对水源的大量索取，目前显示出逐渐萎缩和消失的趋势。本研究首次在该地区盐湖分离鉴定了新型嗜盐古菌，是对该地区微生物物种资源的开发。该菌种资源可进一步作为微生物遗传、生态和分类学等研究的材料，有一定的理论和应用价值。

参 考 文 献

- [1] 潘海莲,周成,王红蕾,等. 内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性的研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 1-6.
- [2] 范华鹏,薛燕芬,曾艳,等. 西藏扎布耶茶卡盐碱湖古菌多样性的非培养技术分析[J]. 微生物学报, 2003, 43(4): 401-408.
- [3] 袁瑞强,程芳琴. 我国盐湖资源综合利用的探讨[J]. 盐湖研究, 2008, 16(1): 86-96.
- [4] 许学伟,吴敏,迪丽拜尔·托乎提,等. 新疆艾比湖和伊吾湖可培养嗜盐古菌多样性[J]. 生物多样性, 2006, 14(4): 359-362.
- [5] 许学伟,吴敏,吴月红,等. 新疆阿牙克库木湖可培养嗜盐古菌的种群结构[J]. 生态学报, 2007(27): 3119-3123.
- [6] 何敏艳,邹正中,蔡林,等. 连云港台北和盐城三圩盐田土壤嗜盐菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 737-742.
- [7] 郑绵平. 论中国盐湖[J]. 矿床地质, 2001, 20(2): 181-189.
- [8] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册(8) [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [9] 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.
- [10] OREN A, VENTOSA A, GRANT W D. Proposed minimal standards for description of new taxa in the Order *Halobacteriales* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47: 233-238.
- [11] CASTILLO A M, GUTIE-RREZ M C, KAMEKURA M, et al. *Halorubrum orientale* sp. nov. a halophilic archaeon isolated from Lake Ejnor, Inner Mongolia, China [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 2559-2563.
- [12] CUI H L, TOHTYD, ZHOU P J, et al. *Halorubrum lipolyticum* sp. nov. and *Halorubrum aidiingense* sp. nov. isolated from two salt lakes in Xinjiang, China [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56: 1631-1634.
- [13] FENG J, ZHOU P J, ZHOU Y G, et al. *Halorubrum alkalicophilum* sp. nov., a novel haloalkaliphile isolated from a soda lake in Xinjiang, China [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 149-152.

Isolation and Identification of an Archaeon Isolated from a Saline Lake in Shaanxi Province

ZHAO Ping ZOU Zheng-zhong WANG Ge-jiao

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/ College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract A halophileic archaeon strain GS1 was isolated from a salt lake water located in Yulin city, Shaanxi Province. A series of tests were performed for strain identification including morphology characterization, Gram staining, NaCl range for growth, Mg²⁺ range for growth and pH range, physiological/ biochemical and 16S rRNA gene analyses. The results indicated that GS1 was a novel extreme halophilic archaeon strain belonging to genus *Halorubrum*. The 16S rRNA gene sequence similarity between strains GS1 and *Halorubrum saccharovorum* (U17346) was 97%. This strain is named as *Halorubrum* sp. GS1. The GenBank accession number of its 16S rRNA gene sequence is FJ793266.

Key words extreme halophilic archaeon; *Halorubrum*; saline lake; Shaanxi Province; 16S rRNA gene

(责任编辑:张志钰)