

## 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究\*

王振雄 徐 毅 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要:**从内蒙古乌都淖咸性盐湖分离到嗜盐碱菌菌株 Y21。其形态为杆状,能运动,红色菌落,通过生理生化、极性脂成分、基于 16S rRNA 序列的系统发育学分析和 DNA-DNA 杂交同源性比较,发现菌株 Y21 是 *Natrilba* 属中一个与其它成员不同的新种,命名为 *Natrilba wudunaoensis* sp. nov.。

**关键词:**嗜盐碱古生菌, 极性脂, 16S rDNA, 系统发育树

**中图分类号:**Q939 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)02-0115-20

嗜盐碱古生菌的生活环境不仅需要高浓度的 NaCl,而且需要高 pH 值和低浓度的  $Mg^{2+}$  离子。根据表型特征的不同,嗜盐碱古生菌分为两个属,即嗜盐碱杆菌属(*Natronobacterium*)和嗜盐碱球菌属(*Natronococcus*),嗜盐碱杆菌属包括四个种:*Natronobacterium gregoryi*、*Natronobacterium magadii*、*Natronobacterium pharaonis* 和 *Natronobacterium vacuolatum*<sup>[1]</sup>。1997 年,结合系统发育学的研究结果,Kamekura 将上述四个种重新进行了分类研究,四个种被分到不同属当中,其中 *Natronobacterium magadii* 被转入 *Natrilba* 属<sup>[2]</sup>。

目前,嗜盐古生菌的分类主要是依据三个方面的信息;表型特征、化学分类数据和分子生物学数据,与以前相比,这种多相分类系统所获得的结果更合理更客观<sup>[1]</sup>。我们的研究就是根据多相分类的原则,对嗜盐碱菌的一个分离物 Y21 分类学进行了研究。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种和培养条件

菌株 Y21 分离自内蒙古碱性盐湖样品。分离和培养采用完全培养基<sup>[3]</sup>:每升中含酪素水解物 7.5g,酵母粉 10.0g,柠檬酸三钠 3.0g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g,KCl 2.0g, $Fe^{2+}$  1mg,NaCl 250g, $Na_2CO_3$  10.0g( $Na_2CO_3$  单独灭菌,用前混合),37℃ 振荡培养一周。对照菌株为 *Natrilba magadii* (NCIMB 2190)、*Natrilba asiatica* 172P1(JCM 9576)和 *Halobacterium trapanicum* (JCM 9743)。

#### 1.2 生理生化试验

生理生化试验参见文献[3]。

#### 1.3 极性脂组分分析

极性脂的提取参照 Ross<sup>[4]</sup>方法进行。提取的极性脂溶于少量氯仿:甲醇(2:1)中,在

\* 国家自然科学基金重点基金(29834100)和微生物资源前期开发国家实验室资助项目

作者简介:王振雄(1972-),男,河南省洛阳人,中国科学院微生物研究所博士研究生,现在美国做博士后

收稿日期:1998-07-29,修回日期:1999-02-05

硅胶板上进行双向薄层层析,第一向展开剂为氯仿:甲醇:水(65:25:4),第二向展开剂为氯仿:甲醇:冰醋酸:水(80:12:15:4),磷脂显色用 Zinzadze 试剂,总脂显色用 50%  $H_2SO_4$ 。

#### 1.4 G + C mol % 含量测定

采用熔点测定法<sup>[5]</sup>。回收对数生长期的细胞,提取总 DNA,溶于  $0.1 \times SSC$  标准溶液中,通过紫外分光光度计检测 DNA 的热变性温度( $T_m$ ),根据公式  $(G + C) mol \% = 50.4 + 2.08(T_m - T_{E. coli})$  计算其  $(G + C) mol \%$ ,以 *E. coli* K12 为对照菌株。

#### 1.5 16S rRNA 扩增和测序

提取总 DNA 后,采用 PCR 的方法扩增 16S rRNA,使用的引物如下:

引物 1: 5' ATTCCGGTTGATCCTGCCGGA3';

引物 2: 5' AGGAGGTGATCCAAGCCGCAG3'。

PCR 扩增条件: 94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 3 min, 36 个循环。PCR 产物连接到质粒 PUC19 上,转化大肠杆菌,提取质粒并测序。

#### 1.6 系统发育树

将菌株 Y21 的 16S rRNA 序列与从 Genbank、EMBL、DDBJ 等数据库中获得嗜盐菌 16S rRNA 序列,采用 Clustalw1.7 软件包进行多序列匹配排列,通过 Treeconw(v. 1.2) 和 PHYLIP(v. 3572) 软件包推测和分析系统发育树<sup>[6]</sup>。

#### 1.7 DNA-DNA 杂交

采用缺刻平移的方法,以  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dATP 掺入菌株 Y21 DNA 片段作为标记探针,与 *Nb. magadii*、*Na. asiatica* 172P1、*H. trapanicum* 总 DNA 68℃ 杂交过夜,液闪计数<sup>[7,8]</sup>。

#### 1.8 数据库存取号 (Accession number)

菌株 Y21 的 16S rRNA 序列已存放在 EMBL 核苷酸序列数据库中,它的存取号是 AJ001376。菌株 Y21 被保存在中国普通微生物保藏中心(AS 1.1971)。其他相关菌株的数据库存取号如表 1。

表 1 16S rDNA 序列来源和数据库存取号

Table 1 16S rDNA sources and accession number

Abbreviation code	Scientific name	Strain	Accession number
<i>Hb. trapani</i> JCM8979	<i>Halobacterium trapanicum</i>	JCM8979	D63786
<i>Hb. trapani</i> NCIMB767	<i>Halobacterium trapanicum</i>	NCIMB767	D14125
<i>Hc. morrhu</i> 2	<i>Halococcus morrhuae</i>	ATCC17082	X00662
<i>Hc. morrhu</i> 1	<i>Halococcus morrhuae</i>	NRC16008	D11106
<i>Nt. asiatica</i>	<i>Natrialba asiatica</i>	JCM9576	D14123
<i>Nt. BIT</i>	<i>Natrialba BIT</i>	JCM9577	D14124
<i>Nb. SSL1</i>	<i>Natronobacterium SSL1</i>	ATCC43988	D88256
<i>Nb. magadii</i>	<i>Natronobacterium magadii</i>	NCIMB2190	X72495
<i>Nb. gregory</i>	<i>Natronobacterium gregoryi</i>	NCIMB2189	D87970
<i>Nc. occultu</i>	<i>Natronococcus occultus</i>	NCIMB2189	Z28378
<i>Nc. amyloly</i>	<i>Natronococcus amyolyticus</i>	Ah-36	D43628
L11		F. J. Post	D14126
<i>Nb. tibetense</i> GA33	<i>Natronobacterium tibetense</i>	AS1. 2123	AB005656
<i>Nb. bangense</i> A33	<i>Natronobacterium bangense</i>	AS1. 1984	Y14028

## 2 结果

### 2.1 形态特征

菌株 Y21 革兰氏染色阴性,长杆状,可运动,菌落呈圆形,表面光滑,边缘整齐,37℃ 光照培养 7 d 菌落为红色,直径约 3mm。

### 2.2 生长条件

菌株 Y21 为极端嗜盐碱菌,其 37℃ 最低生长 NaCl 浓度为 12%,在 12%~15% 盐浓度范围生长良好,最适生长的 NaCl 的浓度为 18%,最佳生长 pH 值为 9.0,最适生长温度为 40℃。

### 2.3 生理生化特性

菌株 Y21 可以从  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  和 Cys 产  $\text{H}_2\text{S}$ ;使  $\text{NO}_3^-$  还原、不能使  $\text{NO}_2^-$  还原;可水解酪素和明胶,不能水解淀粉和吐温,对红霉素、利福平和杆菌肽敏感,对四环素不敏感,可以利用 Asn、Arg、Lys 和 Pro 等氨基酸作为唯一碳源生长,不能以 Ser、Thr 和 Ile 作为唯一碳源生长;乙酸、果糖和麦芽糖可以刺激生长,葡萄糖、蔗糖、乳糖和甘露醇不能刺激生长;还可以利用果糖和麦芽糖产酸,不能利用葡萄糖、蔗糖、乳糖和甘露醇产酸。Y21 与 *Natrilba* 属其它成员特征比较如表 2。

表 2 菌株 Y21 与 *Natrilba* 属成员表型特征的比较

Table 1 Comparisons of phenotypic features of Y21 and the members of genus *Natrilba*

Feature	Y21	<i>Nt. magadii</i>	<i>Nt. B1T</i>	<i>Nt. asiatica</i>
		NCIMB2190	JCM9577	172P1 JCM9576
细胞形态	杆状	杆状	杆状	杆状
菌落大小/mm	2~3	2~3	1~2	2~3
革兰氏染色	-	-	-	-
运动性	+	+	+	+
菌落颜色	红	桔红	白/黄	白/黄
最适 NaCl 浓度/%	18	20	21	24
最适温度/℃	40	37~40	35~40	35~40
最适 pH	9.0	9.5	7.5~7.8	6.6~7.0
产 $\text{H}_2\text{S}$	+	+	+	-
$\text{NO}_3^-$ 还原	+	-	+	+
淀粉水解	-	-	+	-
酪素水解	+	+	+	+
明胶水解	+	-	+	+
葡萄糖产酸	-	-	+	-
麦芽糖产酸	+	-	+	-
G+C mol%	65.4	63.0	60.3~63.1	60.3~63.1

"+" Positive, "-" Negative

### 2.4 极性脂

通过双向薄层层析表明,菌株 Y21 主要含有磷脂酰甘油磷脂 (PGP) 和磷脂酰甘油 (PG),未检测到糖脂的存在。

### 2.5 G+C mol% 含量

菌株 Y21 的  $T_m$  值为 86.3,  $T_{E. coli}$  为 79.1,由公式计算得 DNA 中 G+C mol% 含量为

65.4 mol%。

## 2.6 系统发育树

所构建的嗜盐古生菌系统发育亚树见图 1。它是根据 Neighbor-Joining 方法和 Kimura 双参数矫正模型建立起来的,通过 100 次取样计算其 Bootstrap 值,bootstrap 值都标明在图上。从树上可以看到,以 *Hb. halobium* 作为外群种(outgroup),此系统发育亚树共包括六个类型,其中包括 *Halococcus*、*Natronococcus*、*Natronobacterium*、*Natronorubrum* 和 *Natrialba* 属以及一个新属。菌株 Y21 与 *Nt. magadii*、*Nt. SSL1*、*Nt. B1T* 和 *Nt. asiatica* 172P1 同分在了 *Natrialba* 类群中。

菌株 Y21 与 *Nt. magadii*、*Nt. B1T* 和 *Nt. asiatica* 172P1 的 16S rRNA 序列同源性分别是 96%、96% 和 95%。

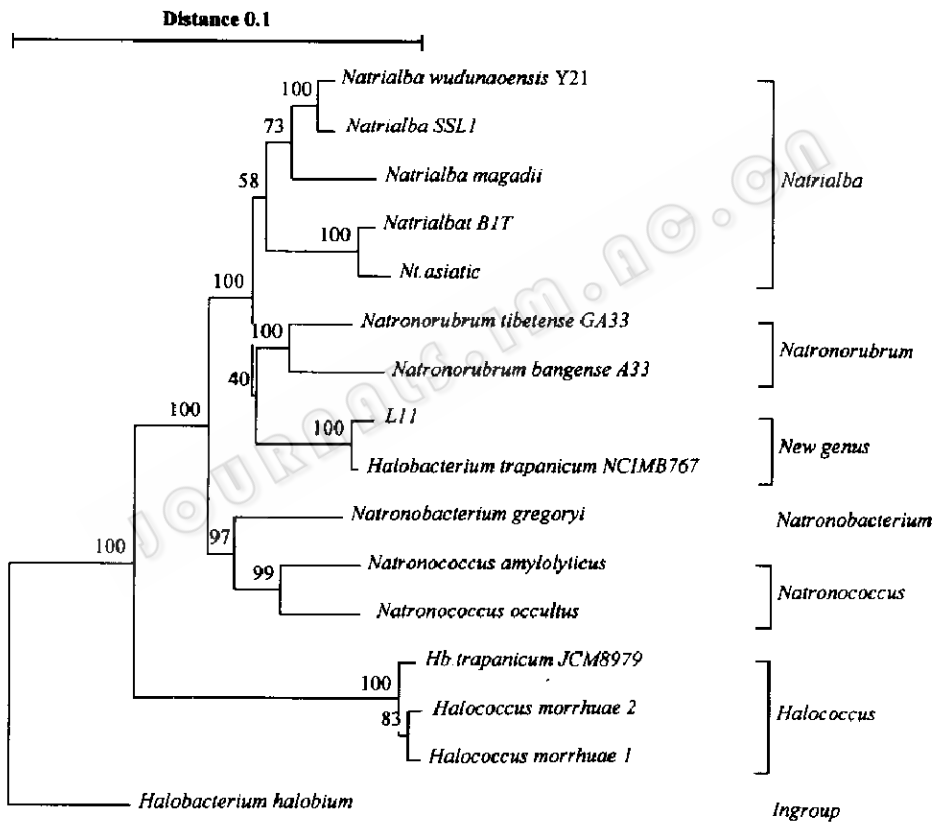


图 1 基于 16S rRNA 序列的嗜盐古生菌系统发育亚树

Fig. 1 Subtree of Halobacterial archaea on the basis of 16S rRNA sequences

The scale bar indicates the 0.05 evolutionary distance unit

## 2.7 DNA-DNA 杂交

菌株 Y21 与 *Nt. magadii* DNA 同源性为 33%,而与 *Hb. trapanicum* 和 *Nt. asiatica* 172P1 小于 10% (*Natrialba* 属中其它成员中 *Nt. B1T* 与 *Nt. asiatica* 172P1 为同一个种, *Nt. SSL1* 尚未定种)。

### 3 讨论

表 2 列出了菌株 Y21 与 *Natrialba* 属中各成员形态及生理生化的比较。菌株 Y21 革兰氏染色阴性,杆状、可运动,可在水中裂解。根据 Kamekura 对各属 *Natrialba* 特征的描述<sup>[6]</sup>,以及嗜盐古生菌不同属主要特征差异的对比来看,菌株 Y21 可以分在 *Natrialba* 属中。同时,我们也发现菌株 Y21 与 *Natrialba* 属中各成员有许多不同,这表明菌株 Y21 可能是新种。

根据新的嗜盐古生菌分类标准<sup>[1]</sup>,新的分类单位应当优先同基于核苷酸序列的系统发育学分析相一致。就嗜盐古生菌而言,系统发育学进化距离(基于 16S rRNA 序列)和表型特征、化学分类数据有非常好的相关性<sup>[1]</sup>。因此,基于 16S rRNA 序列的系统发育学分析在嗜盐古生菌的分类中是十分重要的,尤其是嗜盐碱古生菌,它们缺乏糖脂,无法以极性脂成分作为分类依据<sup>[9,10]</sup>。从系统发育树上,菌株 Y21 与 *Nt. magadii*、*Nt. B1T* 和 *Nt. asiatica* 172P1 分在同一类群中,并且菌株 Y21 与它们的 16S rRNA 序列同源性分别是 96%、96% 和 95%,一般认为,16S rRNA 序列同源性小于 98%,可以认为属于不同种,同源性小于 93%~95%,可以认为属于不同属<sup>[11,12]</sup>。菌株 Y21 与其它成员同源性数值恰好位于 95%~89% 之间。因此,从系统发育树和 16S rRNA 序列同源性角度分析,菌株 Y21 应当是不同与 *Natrialba* 属中各成员的一个新种。DNA-DNA 杂交是确定不同种的基本方法,一般认为同源性小于 70% 可以划分为不同的种<sup>[1]</sup>。菌株 Y21 与 *Nt. magadii* 杂交同源性为 33%,与 *Nt. asiatica* 172P1 杂交同源性小于 10%,这说明它们应当属于不同的种。尽管菌株 Y21 与同属的 *Nt. asiatica* 172P1 杂交同源性偏低,但是由于嗜盐古生菌对属的划分主要依据是极性脂,由于极性脂相同而分在同一属的成员杂交同源性偏低,在嗜盐古生菌中时常能见到。

在 *Natrialba* 属中,每个成员除了都含有磷脂酰某油磷脂(PGP)和磷脂酰甘油(PG)以外,*Nt. B1T*、*Nt. asiatica* 172P1 含有糖脂  $S_2$ -DGD-1,*Nt. SSL1* 含有少量糖脂 DGD-4,*Nt. magadii* 不含有糖脂,菌株 Y21 也未检测到糖脂。菌株 Y21 与 *Nt. SSL1*、*Nt. magadii* 都必须在碱性环境中生长,而 *Nt. B1T* 也可生长在碱性环境中(pH5~10),只有 *Nt. asiatica* 172P1 必须生长在中性环境当中。以上研究表明,从极性脂分类角度看,菌株 Y21 也可以分在 *Natrialba* 属中。不过,同时也表明各个成员之间有相当大的差异。

综上所述,从形态、生理生化、系统发育学分析、16S rDNA 序列同源性、DNA-DNA 杂交试验、极性脂成分等多方面分析,菌株 Y21 是 *Natrialba* 属中的一个新种,命名为 *Natrialba wudunaoensis* sp. nov.。

我们在研究系统发育树时发现,*Natrialba* 属中的成员可以分为两个分支 a 和 b,分支 a 包括 *Nt. B1T*、*Nt. asiatica* 172P1,分支 b 包括菌株 Y21 与 *Nt. SSL1*、*Nt. magadii*。分支 a 的两个成员都含有糖脂  $S_2$ -DGD-1,而分支 b 的成员不含有或只含有少量的糖脂,极性脂在嗜盐古生菌分类方面十分重要;分支 b 中的成员菌株 Y21 与在同一分支的 *Nt. magadii* DNA-DNA 杂交同源性为 33%,表明它们是同属不同种,而菌株 Y21 与分支 a 中的菌株 *Nt. asiatica* 172P1 杂交同源性小于 10%,说明两个分支之间有明显的不同;从生理生化、形态学分析,两个分支也可以明显区分开来。因此,不排除分支 b 会从 *Natrialba* 属中独立出来,建立一个新属的可能性。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Oren A, Ventosa A, Grant W D. *Int J Sys Bacteriol*, 1997, 47: 233~238.
- [ 2 ] Kamekura M, Dyal-Smith M L, Upaani V, et al. *Int J Sys Bacteriol*, 1997, 47: 853~857.
- [ 3 ] 田新玉, 徐毅, 刘洪灿, 等. 微生物学报, 1997, 37(1): 1~6.
- [ 4 ] Ross H N M, Collins M D, Tindall B J, et al. *J Gen Microbiol*, 1981, 123: 75~80.
- [ 5 ] 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯, 等. 放线菌研究及应用. 北京: 科学出版社, 1990. 151.
- [ 6 ] Kamekura M, Dyal-Smith M L. *J Gen Appl microbiol*, 1995, 41: 333~350.
- [ 7 ] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning 2nd ed.* Cold Spring harbor Laboratory Press, 1989. 9. 47.
- [ 8 ] 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯, 等. 放线菌研究及应用. 北京: 科学出版社, 1990. 186.
- [ 9 ] Grant W D, Larsen H, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 3. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. 2216~2233.
- [ 10 ] Mwatha W E, Grant W D. *Int J Syst Bacteriol*, 1990, 172: 3609~3619.
- [ 11 ] Devereux R, he S H, Doyle C L, et al. *J Bacteriol*, 1990, 172: 3609~3619.
- [ 12 ] Fry N K, Warwick S, Saunders N A, et al. *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 1215~1222.

## TAXONOMY OF A NEW SPECIES OF HALOALKALOPHILIC ARCHAEON

Wang Zhenxiang Yu Yi Zhou Peijin

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract:** A strain of Haloalkalophilic Archaeon Y21 was isolated from soda lake in Inner Mongolia Autonomous Region. The isolate is rod shaped, motile and red clone. On the basis of morphology, physiology and biochemistry, polar lipid composition, phylogenetic analysis and DNA-DNA hybridization, we found that strain Y21 is new species of the genus *Natrilba*. The name *Natrilba wudunaoensis* sp. nov. is proposed.

**Key words:** Haloalkalophiles, Polar lipid, 16S rRNA, Phylogenetic tree

..... 书 讯 .....  
.....

《戊型肝炎病毒与戊型肝炎》一书由第二军医大学戚中田教授主编, 香港亚洲医药出版社出版, 大 32 开, 2000 年 2 月正式出版, 18 万字左右, 订价 17 元(加邮挂费共 19 元)。本书内容包括戊型肝炎病毒的特性, 戊型肝炎病毒基因的克隆与鉴定, 戊型肝炎病毒活性的合成与修饰, 戊型肝炎的临床表现与病理, 戊型肝炎的治疗, 戊型肝炎的流行病学与预防和新型肝炎的研究展望。可供临床各科医师、医学院校师生及从事病毒学、分子生物学和基础医学工作的科研与教学人员参考。

联系人: 上海翔殷路 800 号, 第二军医大学微生物学教研室 孙如美 谢正阳 邮编: 200433  
电话: (021)25070268