

中度嗜盐菌的研究进展

任培根 周培瑾

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

Reseach Progress of Moderately Halophilic Eubacteria

Ren Peigen Zhou Peijin

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

关键词 :中度嗜盐菌,真细菌,微生物资源

中图分类号 :Q938 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2003)03-0427-05

地球上存在着多种多样的盐域环境,这类环境中自然形成的,如死海、美国的大盐湖等水环境,还有盐土环境;人工形成的如盐场、盐池等;另外,还有很多盐腌制的食品。自然界的高盐环境由于形成过程和所处地质情况的不同其离子组成和盐浓度有很大差异。生活在这些高盐环境中的动、植物物种较为有限,而以处于不同类群的微生物,如绿藻、嗜盐古菌及嗜盐和耐盐的细菌等为主要生命形式。根据微生物对盐浓度的反应可分为不同的种(如表 1^[1])。

表 1 不同盐浓度下的微生物

分类	反应	举例
非嗜盐菌	在含 0.2 mol/L 盐的培养基中生长最好	多数普通真细菌和多数淡水微生物
轻度嗜盐菌	在含 0.2 ~ 0.5 mol/L 盐的培养基中生长最好	很多海洋微生物
中度嗜盐菌	在含 0.5 ~ 2.5 mol/L 盐的培养基中生长最好,能在低于 0.1 mol/L 盐中生长的被认为是兼性嗜盐菌	<i>Vibrio costicola</i> , <i>Paracoccus halodenitrificans</i> , <i>Pseudomonas</i> species
边缘极端嗜盐菌	在含 1.5 ~ 4.0 mol/L 盐的培养基中生长最好	<i>Extothiorhodospira halophila</i> , <i>Actinopolyspora halophila</i> , <i>Halobacterium volcanii</i>
极端嗜盐菌	在含 2.5 ~ 5.2 mol/L (饱和)盐的培养基中生长最好	<i>Halobacterium salinarium</i> , <i>Halococcus morrhuae</i>
耐盐菌	能耐盐的非嗜盐菌。若生长范围超过 2.5 mol/L 盐可被认为是极端耐盐微生物	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , Solute-tolerant yeasts, fungi, and algae.

中度嗜盐菌(Moderately halophilic bacteria)近年来正受到越来越多的重视,与此相关的研究也日益广泛和细致。Kushner^[2]给中度嗜盐菌下的定义为:在 0.5 mol/L(约 3%)和 2.5 mol/L(约 15%)NaCl 浓度之间有最佳生长的细菌。但是,对于一个中度嗜盐菌菌株,它的盐浓度范围会随着环境条件(如温度、营养状

基金项目:中国科学院创新工程项目(KSCS2-3-01)

作者简介:任培根(1973-),男,中国科学院微生物研究所博士研究生,从事极端环境微生物方面工作。E-mail:ren-pg@vip.sina.com

收稿日期:2002-09-16,修回日期:2002-12-08

况等)的改变而不同 因此在把生长所需盐浓度范围作为中度嗜盐菌的特征时应该注意这一点。另外,也有人倾向于将中度嗜盐菌定义为在 5%~20% 盐浓度有最佳生长的细菌^[3]。

在我国的新疆、内蒙、西藏等地区广泛存在着高盐环境。研究表明内陆地区高盐环境中存在的微生物区系有其独特性,不同于海洋(或沿海)高盐环境。对这类环境进行微生物资源调查,了解此类环境中的微生物分布情况,是合理利用资源的重要前提。我国微生物学研究人员对这些环境中的嗜盐古菌进行了较为详尽的研究,但对其中包括中度嗜盐菌在内的真细菌的研究尚少,亟待加强这些方面的研究。

1 中度嗜盐菌的研究历史

最早有关中度嗜盐菌的研究是 LeFevre 和 Round^[4]在 1919 年在对黄瓜发酵盐水进行微生物学研究时,在 0%~15% NaCl 浓度范围内分离了一个类群的无色素的细菌。1935 年, Hof, T. 做过更具微生物学意义的研究,她分离命名的一株中度嗜盐菌 *Pseudomonas beijerinckii*, 该菌株在 3%~18% NaCl 浓度生长但不能在 0.5% 以下时生长,体现出典型的中度嗜盐菌的特点。1940 年, Elazari-Volcani 曾对死海中分离的中度嗜盐菌做过一些描述。1956 年, Baxter 和 Gibbons^[5]最早使用中度嗜盐菌这一名词来描述这一类细菌。在很长一个时期内对中度嗜盐菌的研究都很少,到 1980 年之前,细菌名称核准名录(Approved Lists of Bacterial Names)中符合中度嗜盐菌定义的只有 6 个种。

在对高盐环境的早期研究中,中度嗜盐菌被忽略了。相对于极端嗜盐古菌,中度嗜盐菌的分布更为广泛,盐生长浓度更宽(但通常要低一些),对营养的要求低,更易于适应环境。同时,对它们进行研究时可以方便的利用以细菌为基础发展起来的分子生物学技术,通过它们来解答有关嗜盐机理等方面的问题也许会更为容易。Kushner^[2]曾说:尽管中度嗜盐菌似乎不如极端嗜盐古菌更令人感兴趣,但它们拥有很多尚未解答的问题,特别是它们能在很宽的盐浓度范围生长的能力。如果过去的 10 年属于极端嗜盐古菌,可以预测下一个 10 年中度嗜盐菌将得到它在科学上正确的位置。

2 中度嗜盐菌栖息的环境

中度嗜盐菌不仅在高盐环境中分布,在海水、沙漠等环境中也有发现,这点与极端嗜盐古菌不同。在同一环境中,中度嗜盐菌和极端嗜盐古菌占据着不同的生境,它们只在很小的盐浓度范围有重叠。中度嗜盐菌在环境中是动态分布的,环境温度和营养条件对它们的盐生长浓度有很大的影响。通常,盐浓度较低的环境中嗜盐细菌占优势,较高(30%以上)时则以嗜盐古菌为主;中等浓度(20%~30%)时温度和营养条件成为决定因素,低温时嗜盐细菌的生长速度比嗜盐古菌更高,高温时则相反;低营养时细菌占绝对优势,营养丰富时细菌也多于古菌(即使盐浓度高达 25%时)。相比于高盐水,高盐土壤中存在的微生物类群同非含盐土壤中的微生物类群的相似程度更高,说明在环境中一般因素对于决定一个特定生境中微生物类群的作用要比单一因素(如高盐)重要的多。很多由高盐土壤分离的菌株能在较低盐度(0.5%~2.0%)下生长,这可能是因为在水体中的盐浓度相对稳定,而盐土中的盐浓度则变动较大,如降水可以导致盐土中盐浓度的显著下降。

存在于各种盐域环境中的微生物区系在适应环境的同时也在对环境进行着改造。很难把中度嗜盐菌的作用与共存于同一生境中其它微生物的作用分开,但不可否认它们在其中的作用。有很多研究结果证实中度嗜盐菌对所处环境中碳、氮、硫和磷的循环中充当重要角色。事实上,这类微生物在盐域环境中所占比重相当大,并非想象中那样有限。

对很多的高盐环境进行过较详尽的生态学研究,但是除了盐浓度外,这些环境中必定还存在着其它的中度嗜盐菌的抑制因素,这方面的研究还很少,而这些抑制因素可能控制着微生物在高盐生境中的群体规模以及生态周转。

中度嗜盐菌是如何分布到全球范围的问题也值得考虑。目前有两种假说,一种是通过水,因为这类生物中有的可以在高盐和无盐的环境中生存;另一个是谓通过包裹在不同条件下形成的盐的晶体中传播。

极端嗜盐微生物可以在 NaCl 晶体中存活已被证实。中度嗜盐菌也有可能靠这种方法来广泛传播,不过还没有这方面的研究。

3 中度嗜盐菌的嗜盐机理

中度嗜盐菌是通过在细胞内积累一些被称为相容性溶质(Compatible solutes)的物质来抵抗细胞外的高渗透压。任何处于高渗环境中的生物其细胞内必须含有一定浓度的溶质以保持细胞内外渗透压的平衡,维持细胞的形态、结构和生理功能。通常细胞内积累的溶质不同于细胞外的主要溶质,同时这些细胞内溶质不能妨碍细胞的其它代谢途径,因此被称为相容性溶质。相容性溶质是一些高度水溶性的小分子物质,如糖、糖醇、其它的醇类、氨基酸,及氨基酸的衍生物。它们可以在高 NaCl 浓度中保持细胞内的低水活度,从而保持细胞内酶的活性。不同的生物各自积累不同的相容性溶质,如 KCl 在古菌中,多元醇(Polyols)在真核生物中,而甜菜碱和四氢嘧啶在细菌中^[6]。甜菜碱和四氢嘧啶属于氨基酸衍生物,中度嗜盐菌既可以从环境中直接获取它们,也可以从环境中吸收它们的底物(如胆碱等)来合成它们。

4 中度嗜盐菌的组成

20 世纪 90 年代开始对各种地理条件下的高盐环境进行了广泛的研究,从中分离并命名了大量的中度嗜盐菌,对于这一类群的生物有了更深的了解。中度嗜盐菌是由具有不同生理生化特征的、分布于很多不同属的细菌组成,在很多主要的细菌门类中,如: *Spirochetes*, *Proteobacteria*, *Flavobacterium-Bacteroides*, Low-(G+C) 以及 High-(G+C) 革兰氏阳性微生物中都有中度嗜盐菌。为方便起见,将它们分为专性厌氧菌和需氧或兼性厌氧菌来叙述^[7]。

革兰氏阴性的需氧或兼性厌氧的中度嗜盐菌包含于 *Halomonadaceae* 科^[8,9], *Pseudomonas* 属、*Flavobacterium* 属和 *Spirochaeta* 属,其中后 3 个属中同时还含有非嗜盐的种,以下属中只含有嗜盐的种: *Alkalispirillum*, *Arhodomonas*, *Dichotomicribium*, *Fundibacter*, *Methylarcula*, *Rhodobium*, *Salinivibrio*, *Silinivibrio* 和 *Thalassomonas*。在 *Halomonadaceae* 科中含有 3 个属: *Halomonas*, *Chromohalobacter* 和 *Zymobacter*。在本科中,属、种的变动很大,其中一半以上的种至少被重新分类和命名过一次。近年来应用分子生物学和多相分类的方法进行了很多的研究使这个科基本稳定下来。其中 *Halomonas* 属就是由以前的 *Halomonas* 属、*Deleya* 属和 *Volcanicella* 属合并而得。目前在 *Halomonas* 属中有 20 个有效发表的种^[10], *Chromohalobacter* 属和 *Zymobacter* 属中分别有 4 个和 1 个种。其它几个只含有嗜盐菌的属一般只含有一个种。

革兰氏阳性的专性好氧或兼性厌氧的中度嗜盐菌中,除放线菌中的 *Actinopolyspora* 和 *Nocardiopsis* 各有一个种, *Bacillus* 有两个种外^[11], 以下属均只含有嗜盐菌,包括 *Filobacillus* 属、*Halobacillus* 属、*Marinococcus* 属、*Salinacoccus* 属、*Nesterenkonina* 属、*Salibacillus* 属及 *Tetragenococcus* 属,以上几个专性嗜盐的属也都是近年来发表的, *Salibacillus* 属中的两个种都是由 *Bacillus* 属转过来的^[12]。

专性厌氧的中度嗜盐菌不多,两个科的细菌具有代表性,即 *Haloanaerobiaceae* 科和 *Ectothiorhodospiraceae* 科^[13]。 *Ectothiorhodospiraceae* 科目前只含有一个属,即 *Ectothiorhodospira* 属,本属中共有 7 个种,它们又可分为两个亚群,一个亚群含极端嗜盐的种,另一个亚群含的是中度嗜盐的种,包括 *E. mobilis*, *E. vacuolata*, *E. marismortui* 和 *E. shaposhnikovii* 这 4 个种^[14]。 *Haloanaerobiaceae* 科有 3 个属,分别是 *Haloanaerobium* 属、*Halobacteroides* 属和 *Sporohalobacter* 属。这 3 个属中所含的种均为中度嗜盐,低 GC 含量,革兰氏阴性,中温性的杆菌。 *Haloanaerobium* 属目前已有 10 个种, *Halobacteroides* 属和 *Sporohalobacter* 属各有两个种。

目前,使用分子生物学方法研究微生物在环境中的生物多样性已在多种极端环境中开展过。这些方法基本上都是利用 PCR 扩增来获得环境中微生物区系的 16S rDNA 的信息,然后进行系统分类学研究。较为简单的如扩增核糖体 DNA 限制分析(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA),它是把 rDNA 扩增产物用一种或两种限制性内切酶切割后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后来分析所获得的指

纹信息。这种方法的优点是快速、经济,但是它只能得到所研究环境中具有数量优势的或容易得到扩增产物的种类。如果想获得更多的信息,可以通过将从环境中得到的每个 16S rDNA 扩增产物进行克隆和测序。在一个高度生物多样性的环境中,这意味着巨大的工作量和较大的花费。利用这些非培养手段,我们发现极端环境的生物多样性以前被大大低估了。也许,物种多样性低不再是高盐环境的特点。

5 中度嗜盐菌的应用

中度嗜盐菌对环境有极强的适应能力,在自然界中广泛分布,人们对于它们潜在的生物技术方面的应用充满了兴趣。中度嗜盐菌的用途很广泛且由来已久,比如 *Tetragenococcus* 的菌株很久以前就被用于食品如酱油等的发酵中。目前对中度嗜盐菌应用方面的研究主要集中在对它们产生的酶,一些功能性分子、大分子多聚物以及生物环保等方面^[4]。

随着人类活动的不断增强,环境污染日渐严重以至于影响到人类的生存和发展。在造纸厂,每生产 1 吨纸将生成 175m³ 的废水,重金属污染也很严重,最近在印度发生的砷中毒就有数百万人受害。造纸厂废水,砷矿废水,还有许多人活动造成的环境是高盐或高盐碱的,中度嗜盐菌在这类环境中可以很好的生存。而且中度嗜盐菌作为最基础的代谢者,配合着酵母、原虫等其他微生物,可以将很多对人类和动植物有害的物质改造成为低害甚至无害的物质释放出来。中度嗜盐菌的这一生理特点,使得其在环保方面有良好的应用前景。

中度嗜盐菌产生的酶可以在高盐、高 pH 值情况下发挥作用,因而可使一些特殊环境下的生物降解得以实现。如利用一株嗜盐碱的 *Staphylococcus* 产生的木糖酶对农业生产中产生的秸秆等进行处理,可以使这些农业副产物得到更有效的利用^[15]。在造纸企业中也可以用此类生物酶对纸浆中的木糖进行前处理从而有效的减少造纸污水对环境的污染^[12]。很多实验室对中度嗜盐菌来源的其它酶如淀粉酶、核酸酶、蛋白酶等进行了大量的研究并且试图用于实际生产生活中。

另一个研究的热点是相容性溶质。近年来对它们的研究极受重视。由于它们可以被用作刺激保护剂(对抗高盐、热变性、干燥、冰冻)和酶、核酸、膜及细胞的稳定剂,在酶应用技术、制药和化妆品工业方面的前景最为引人注目。以 *Halomonas elongata* 为主要实验模型^[16],对相容性溶质的合成途径、功能等方面进行了大量的研究。在实际生产中,开发出一种被称为“细菌挤奶(Bacteria milking)”的工艺,此工艺是通过反复的高渗和低渗刺激细胞,使它们在胞内积累而向培养基中排出相容性溶质。比如,用 *Halomonas halodenitrificans* 进行四氢嘧啶的生产,每升培养基每天可得到 2g 的四氢嘧啶。另外,有人考虑利用基因工程技术把产生相容性溶质的基因转入农作物基因组中而使它们能在高盐泥土中生长,这样不但提高了粮食产量,而且提高了土地利用效率。

细菌性多糖在石油的回收时有很好的增强效果,这是由于它们的表面活性和生物乳化性质。因为石油沉积层的环境经常是盐水环境,因此使用抗盐的表面活性剂应该更为有力。Pffinner 等在油井及油井相关的环境中分离了大量可以产胞外多糖的菌株,其中一株未鉴定的 *Bacillus* 的菌株可以在 NaCl 浓度高达 12% 时生长,它产生的具有假塑性体状态的多糖在抗剪切和热解方面都比目前使用的黄原胶(Xanthan gum)要好。另外, *Halomonas eurihalina* 的菌株 F2-7 产生的一种胞外多糖在酸性 pH 下有很高的粘性并具有假塑性状态,可以用作乳化剂,相信在食品、制药工业中都有广泛的用途^[17]。

随着对极端环境微生物研究投入的逐渐加大,会获得更多的有价值的中度嗜盐菌菌株,届时会给人类带来更多的益处。

过去十几年中的研究大大增加了我们对中度嗜盐菌的生理学、生态学、分类学以及系统发育方面的知识,它们在一些领域的潜在的工业价值也进一步促进了对它们的研究和了解。但目前所知道的是远远不够的,对于这类微生物的研究仍旧极具吸引力,利用各种手段,特别是那些新的分子技术去阐明中度嗜盐菌在环境中的生物多样性及明确它们的分类是今后亟待进行的工作。

参 考 文 献

- [1] Kushner D J. The halobacteriaceae. In : Sokatch J R ,Ornston L N. ed. The Bacteria , a Treatise on Structure and Function , vol VIII . San Diego :Academic Press ,1985. 171 ~ 206.
- [2] Kushner D J. Life in high salt and solute concentrations : halophilic bacteria. In : Kushner D J. ed. Microbial Life in Extreme Environments. London :Academic Press ,1978. 317 ~ 368.
- [3] Ramos-Cornenzana A. Ecology of moderately halophilic bacteria. In : Vreeland R H ,Hochstein L I. ed. The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Raton :CRC Press ,1993. 55 ~ 86.
- [4] LeFevre E ,Round L A. A preliminary report upon some halophilic bacteria. *J Bacteriol* , 1919 , 4 : 177 ~ 182.
- [5] Baxter R M , Gibbons N E. Effects of sodium and potassium chloride on certain enzymes of *Micrococcus halodenitrificans* and *Pseudomonas salinaria* . *Can J Microbiol* ,1956 2 :599 ~ 606.
- [6] Imhoff J F ,Rodriguez-Valera F. Betaine is the main compatible solute of halophilic bacteria. *J Bacteriol* ,1984 ,160(1):478 ~ 479.
- [7] Ventosa A , Nieto J J , Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* ,1998 62(2):504 ~ 544.
- [8] Dobson S J , Franzmann P D. Unification of the genera *Deleya* (Baumann , et al. 1983) , *Halomonas*(Vreeland , et al. 1980) , and *Halovibrio*(Fendrich . 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans*(Robinson , Gibbons . 1952) into a single genus , *Halomonas* , and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae* . *Int J Syst Bacteriol* , 1996 , 46 : 550 ~ 558.
- [9] Franzmann P D , Wehmeyer U , Stackebrandt E. *Halomonadaceae* fam. nov. , a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya* . *System Appl Microbiol* , 1988 11 :16 ~ 19.
- [10] Arahah D R , Ludwig W , Schleifer K H , et al. Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2002 52 :241 ~ 249.
- [11] Arahah D R , Marquez M C , Vocani B E , et al. Reclassification of *Bacillus marismortui* as *Salibacillus marismortui* comb. nov. . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2000 , 50(4):1501 ~ 1503.
- [12] Bajpai P. Microbial degradation of pollutions in pulp mill effluents. In : Laskin A I , Bennett J W , Gadd G. ed. Advances in Applied Microbiology , vol 48. San Diego :Academic Press , 2001. 79 ~ 127.
- [13] Ollivier B , Caumette P , Garcia J L , et al. Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol Rev* , 1994 38(1): 27 ~ 38.
- [14] Imhoff J F. The family *Ectothiorhodospiraceae* . In : Balows A , Trüper H G , Dworkin M , et al. ed. The prokaryotes , vol 4. New York :Springer-Verlag Press , 1992. 3222 ~ 3229.
- [15] Gupta S , Kuhad R C , Bhushan B , et al. Improved xylanase production from a haloalkaphilic *Staphylococcus* sp. SG-13 using inexpensive agricultural residues. *World J Microbiol Biotechnol* , 2001 , 17 5 ~ 8.
- [16] Robert H , Marec C L , Blanco C , et al. Glycine betaine , carnitine , and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of *Tetragenococcus halophila* . *Appl Environ Microbiol* , 2000 , 66(3): 509 ~ 517.
- [17] Margesin R , Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* , 2001 5 :73 ~ 83.

重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”,如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。另外,从2002年开始,凡被本刊录用的文章均统一纳入“万方数据——数字化期刊群”,有不同意见者,请先声明。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

《微生物学报》编辑部