

## 青海两盐湖细菌多样性研究

柴丽红 崔晓龙 彭 谦 徐丽华 姜成林\*

(云南大学 云南省微生物研究所 教育部微生物资源重点实验室 昆明 650091)

**摘 要** :用 DGGE 法和纯培养法 ,对青海柯柯盐湖、茶卡盐湖底泥及周边土壤样品的细菌多样性进行了研究。结果显示 ,两个盐湖存在大量的未知细菌 ,分离到的纯培养仅占实有细菌的小部分。采用多相分类方法 ,鉴定了 12 株纯培养细菌 ,属 5 个可能的新种 ,另有一株菌可能成立一个新属。认为提出新思路、设计新程序 ,从自然极端环境取样 ,分离未知菌 ,是微生物资源开发利用的关键之一。

**关键词** 盐湖 细菌多样性 DGGE

中图分类号 :Q939 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209(2004)03-0271-05

自 80 年代末期 ,一些学者就提出 ,我们所获得纯培养的微生物 ,其实只占实际存在微生物的一小部分。最近几年 ,许多实验室用分子手段研究环境微生物多样性的结果表明 ,土壤环境确实存在大量的未知(未获得纯培养、未经鉴定)微生物 ,可培养的微生物仅为 1% 左右 ,甚至更少<sup>[1,2]</sup>。因此 ,传统纯培养研究方法对环境微生物多样性所得到的结果并没有真实或完全反映自然环境微生物群落的物种组成与结构。如何研究、发掘约占 99% 的未知微生物世界 ,千方百计获得纯培养 ,为微生物资源开发利用提供新菌源 ,是一项十分重要的研究内容。

地球上存在各种各样的极端环境 ,那里的微生物必然有特殊的代谢类型 ,并可能产生特殊的产物。如果我们用同样的观点审视极端和其它自然环境 ,那里必然有更多的未知微生物 ,更值得研究<sup>[3-5]</sup>。我国西北存在大量的盐碱地、盐湖 ,为我们研究盐碱环境微生物提供了理想的研究对象。我们同时用纯培养和免培养法研究了青海茶卡盐湖、柯柯盐湖的细菌多样性 ,现报告部分结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集与菌株分离

2001 年 8 月 ,采集青海茶卡盐湖、柯柯盐湖的底泥和湖边土壤样品 ,装于无菌塑料瓶。每个样品由 5 个点的底泥或土壤混合而成。

经过多种培养基和培养条件试验 ,确定菌株分离培养基为 :用茶卡盐湖底泥样制备的浸汁 300mL ,蛋白胨 5g ,酵母抽提物 4g ,麦芽膏 10g ,葡萄糖 4g , NaCl 68g ,MgCl<sub>2</sub> 60g ,KCl 6g ,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 25g ,琼脂 20g ,水 700mL ,调 pH 至 7 ,加入 50mg/L 的制霉菌素抑制真菌。用平板稀释法分离细菌。培养条件 :28℃ 约 7d。

### 1.2 变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ,DGGE)

**1.2.1 总 DNA 的提取和 PCR 扩增** :采用 Orsini 等的方法<sup>[6]</sup>提取总 DNA ,用两套引物( set 2 :341F-GC/907R<sup>[7]</sup> , set 1 :1055F/1406R-GC<sup>[8]</sup> )进行 PCR 扩增。反应体系(宝生物工程大连有限公司提供的 TaKaRa Ex Taq™ 试剂盒) :10 × Ex Taq 缓冲液 5μL , dNTP Mix 4μL ,正向引物 4μL ,反向引物 4μL ,DNA 模板 1.5μL , 50% 乙酰胺 5μL , Ex Taq 酶 0.2μL (1U) , ddH<sub>2</sub>O 加至 50μL。PCR 条件为 95℃ 5 min ;之后进行 18 个循环 [每个循环为 95℃ 1min ,退火 1min (第一个循环退火温度为 60℃ ,以后每个循环降低 1℃ ,直到 43℃) , 72℃ 3min] ;然后再进行 20 个循环 (95℃ 1 min ,43℃ 1 min ,72℃ 3 min) ;最后 72℃ 10 min。

**1.2.2 DGGE** :DNA 扩增片段进行 DGGE 电泳(Decode™ Universal Mutation Detection System ,Bio-Rad)。胶板面积为 16cm × 16cm。DGGE 电泳条件为 6% 的聚丙烯酰胺 ,30% ~ 62.5% 的变性剂梯度(7mol/L 的尿

基金项目 科技部基础研究重大项目前期研究专项(2002C0001P) ,国家自然科学基金项目(30260004 ,30270004)

\* 通讯作者。Tel 86-871-5034139 ; Fax 86-871-5173878 ; E-mail : lihxu@ynu.edu.cn xlcui@ynu.edu.cn

作者简介 柴丽红(1977 - ) ,女 ,陕西人 ,硕士研究生 ,研究方向为微生物生态 ,毕业后分配到长安大学环境工程学院工作。E-mail : lhchaiwhy@yahoo.com.cn

其他作者 王 涛 ,李文均 ,段若玲

收稿日期 2003-08-18 ,修回日期 2003-10-20

素 40% 的甲酰胺为 100% 的变性剂浓度), 120V 恒定电压 60℃ 下电泳 8h。

### 1.3 菌株鉴定

**1.3.1 形态学研究 and 生理生化实验** : 使用酵母膏-麦芽膏琼脂<sup>[9]</sup> 接种后 28℃ 培养 7、15d, 形态特征用显微镜和电子显微镜(EPMA-8705)观察, 拍照。培养特征, 生理生化特征按照 Shirling & Gottlieb<sup>[9]</sup> 的方法进行。斜面菌体颜色与 ISCC-NBS color charts (standard sample No. 2106) 色卡<sup>[10]</sup> 比较。

**1.3.2 DNA 提取、克隆筛选和序列分析** : 菌株染色体 DNA 采用 Orsini 等的方法<sup>[6]</sup> 提取。16S rDNA 的 PCR 扩增引物为 : 引物 A 8-27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和引物 B 1523-1504R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') (引物的碱基位置参照大肠杆菌的相应位置<sup>[10]</sup>)。反应体系同 DGGE 分析。PCR 条件为 95℃ 5 min, 95℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 3min, 进行 35 个循环; 72℃ 10 min。1.5 kb 的 16S rDNA 扩增片段用琼脂糖凝胶电泳纯化。用 Promega pGEM-T Easy Vector System II 试剂盒进行克隆, 菌株(克隆)筛选用 *Afa* I 和 *Hae* III 酶切扩增重组质粒插入片段。质粒提取参照韩志勇等的方法<sup>[12]</sup>。DNA 测序由宝生物工程大连有限公司完成; 测序引物: KMS098PB1r (5'-TAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), KMS584P1r (5'-TGCTGGCAACACAGAACAAG-3') 和 MS584P2r (5'-ACTCTGCCTGCCCGTATCG-3')。DNA 序列分析用 ABM PRISM™ 377XL DNA 序列分析仪 (Applied Biosystems, Inc.)。

**1.3.3 系统发育分析** : 用 Blast 软件在 GenBank 网站上进行相似性搜索, 获取相近典型菌株的 16S rRNA 基因序列。用 Clustal X 程序<sup>[13]</sup> 进行比对, 根据 Kimura<sup>[14]</sup> 2 参数法计算进化距离, 用邻接法<sup>[15]</sup> 构建系统进化树。进化树拓扑分析为 1000 次重复取样<sup>[16]</sup> 的结果, 生成的树用 TreeView 编辑、打印。

## 2 结果

### 2.1 两个盐湖的概况

柯柯盐湖位于柴达木盆地中部, 地理座标为东经 97°58' 至 98°30', 北纬 36°50' 至 37°06'; 茶卡盐湖位于柴达木盆地之东部, 地理座标为东经 99°02' 至 99°12', 北纬 36°18' 至 36°45'。这两个盐湖距离相近、环境相似, 两盐湖地层自下而上均依次为: 细粉砂, 砂质粘土, 淤泥, 石盐层。茶卡盐湖的水型为晶间水, 含  $\text{Na}^+$  80231 mg/L,  $\text{Mg}^{2+}$  26506 mg/L,  $\text{K}^+$  4473 mg/L,  $\text{Ca}^{2+}$  124 mg/L,  $\text{Cl}^-$  187705 mg/L,  $\text{SO}_4^{2-}$  23625 mg/L,

$\text{CO}_3^{2-}$  173 mg/L,  $\text{HCO}_3^-$  27 mg/L。柯柯盐湖除  $\text{Ca}^{2+}$  含量比较高(231 mg/L)外, 离子种类和含量与茶卡盐湖都比较接近<sup>[17]</sup>。两个盐湖的石盐已被开采。我们分别采取淤泥、及湖边土层作为样品, pH 约 6.5。CT 表示茶卡盐湖周边土样, 20 份样品混匀; CN 表示茶卡盐湖泥样, 10 份样品混匀; KT 表示柯柯盐湖周边土样, 33 份样品混匀; KN 表示柯柯盐湖泥样, 10 份样品混匀。

### 2.2 DGGE 分析的结果

用两套引物 (set 2 : 341F-GC/907R<sup>[7]</sup>, set 1 : 1055F/1406R-GC<sup>[8]</sup>) 进行 PCR 扩增, 经 DGGE 分析, 结果列于表 1。

表 1 两套引物扩增产物的 DGGE 分析结果

Table 1 The DGGE results of PCR products amplified by primer set 1 and set 2

	Primer set 1				Primer set 2			
	CN	CT	KN	KT	CN	CT	KN	KT
DGGE band	16	12	18	16	9	8	11	6
Same band	5		7		2		3	
Same band		2				1		

根据 DGGE 的原理, 每一个条带大致与群落中的一个优势菌群或操作分类单位 (Operational taxonomic unit, OTU) 相对映。表 1 的结果表明, 用 1055F/1406R-GC 引物扩增, 进行 DGGE 分析, 茶卡盐湖底泥约有 16 种优势细菌菌群, 湖边土壤有 12 种, 其中有 5 种在底泥和土壤中都有分布。柯柯盐湖底泥约有 18 种优势细菌菌群, 湖边土壤有 16 种, 其中 7 种是两种样品所共有的。用 341F-GC/907R 引物所得的结果相似, 但 DNA 条带要少许多, 说明该套引物更适合群落的多样性分析。尽管两个湖泊的距离较近, 但是, 用两套引物分析所得的结果都表明, 两个湖泊相同的优势细菌菌群却非常少, 仅 1~2 种。

### 2.3 纯培养分析

仅对柯柯盐湖底泥的混合样品使用平板稀释法分离其中的细菌, 根据菌落大小、形态、颜色特征, 挑菌, 并菌, 最终获得 16 株纯培养菌株, 编号为 KN1~KN16。这 16 株菌用 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) 分析, KN5, KN6, KN7 的 *Afa* I 和 *Hae* III 的酶切图谱相同, KN9, KN12, KN14 相似。最后选择 12 株差异较大的菌株, 进行多相分类。

12 个菌株的 16S rRNA 基因克隆测序结果表明, KN11 的 16S rDNA 全序列分析表明其属于

Halomonadaceae 科 *Halomonas* 属,其余菌株均属于 Bacillaceae 科,分属于 *Halobacillus*、*Salibacillus*、*Amphibacillus*、*Virgibacillus*、*Gracilibacillus*、*Bacillus* 等 6 个属。KN1 与 KN8 仅测定了约 500bp 的 16S rDNA 序

列,系统发育分析表明二者与 *Bacillus astrophaens* 序列的相似性几乎为 100%。为做进一步研究,归属于 Bacillaceae 科的 10 株菌的 16S rDNA 全序列用邻接法构建的系统发育树如图 1 所示。

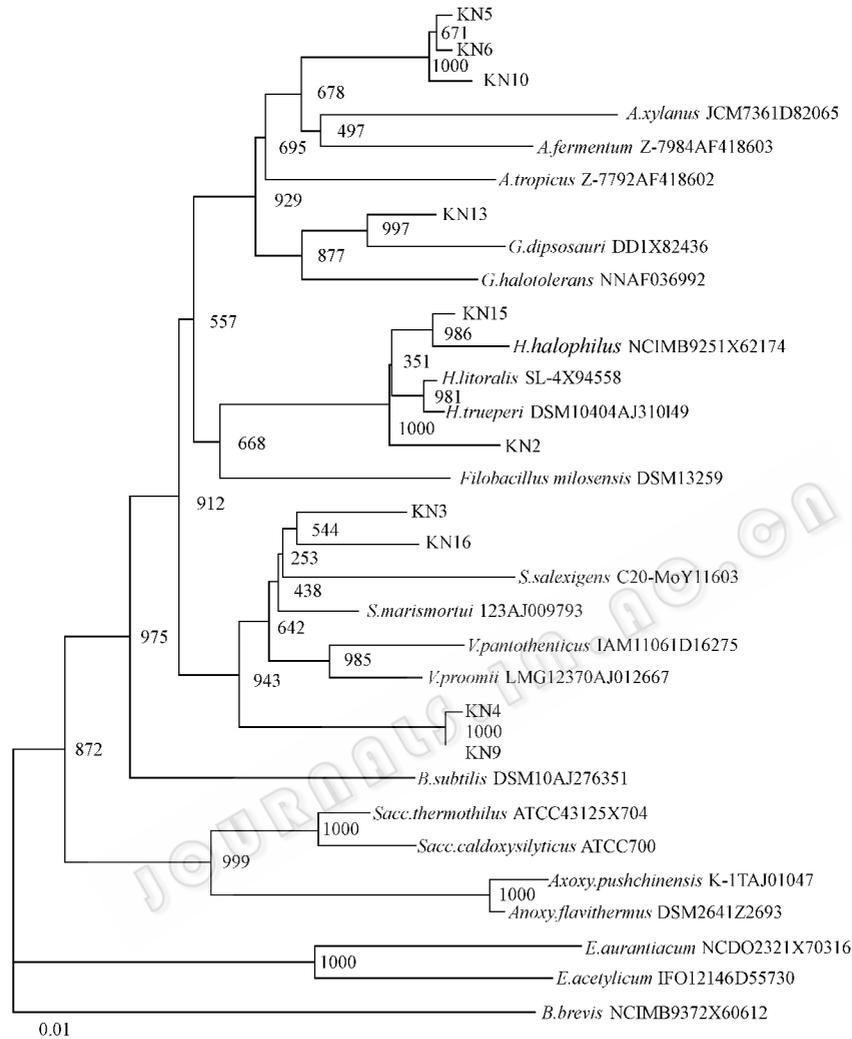


图 1 邻接法构建的 10 株菌的近全序列系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining phylogenetic tree

根据系统发育分析、形态、生理生化特征,并与已知典型菌株进行比较,其中 10 株菌可能为 5 个新种,并初步将 KN3 定为耐盐盐生芽孢杆菌(*Salibacillus halotolerans* sp. nov.), KN16 定为青海盐生芽孢杆菌新种(*Salibacillus qinghaiensis* sp. nov.), KN10 定为嗜盐兼性芽孢杆菌新种(*Amphibacillus halophilus* sp. nov.), KN13 定为青海纤长芽孢杆菌新种(*Gracilibacillus qinghaiensis* sp. nov.), KN2 定为乳白喜盐芽孢杆菌新种(*Halobacillus opalescens* sp. nov.)。

KN4、KN9 与 *Salibacillus* 属及 *Virgibacillus* 属聚为一大簇,但是在这两个属之外形成了一个单独的分支。*Salibacillus marismortui* 与这两个菌株序列的

最小差异分别为 3.28% 和 3.13%。因此 KN4、KN9 极有可能是 Bacillaceae 科内一个新的属一级的分类单位。

## 2.4 纯培养和 DGGE 对比的实验结果

柯柯盐湖分离到的 16 株纯培养菌株的 DNA 和柯柯盐湖底泥混合样品的总 DNA,均用第一套引物 1055F/1406R-GC 进行 PCR 扩增,PCR 产物在相同条件下做 DGGE 电泳。柯柯盐湖仍得到 18 条带。纯培养的 12 菌株,分别有 4、2、2 在相同位置,其余 4 个菌株在不同位置;但这些纯培养的 DGGE 带谱却集中在一个很狭窄的范围内,仅占带谱总长度的 18%,且位于 60%~67% 范围的变性胶中。

### 3 讨论

DGGE 是目前国外采用较多的一种研究微生物多样性、群落时空动态的免培养分析法。它的基本原理是不同种微生物的 DNA 片段在不同的变性梯度胶中电泳行为不同,可利用变性梯度凝胶电泳将它们分开。在实际应用时并不那么简单,影响 DGGE 分析结果的因素很复杂,贯穿 DNA 提取到电泳的全过程。第一,环境因素(样品的有机质、矿物质等)不同,它们会对 DNA 提取造成干扰。第二,同一环境中各种微生物的多少各不相同,提取时,破碎每一种微生物细胞壁的难易程度也不同。因此,要用同一种方法,把不同环境中所有微生物的染色体 DNA 都能提出来,是十分困难的。第三,由于提取到的环境微生物的 DNA 的量极为有限,必须得进行 PCR 扩增才能做电泳。但在选择引物时必然“照顾”不到所有的微生物,PCR 条件也不可能满足所有的微生物,其结果是有的扩增很好,有的就根本没有被扩增。本研究所用的第一套引物(1055F/1406R-GC<sup>81</sup>)的扩增的效果就明显优于第二套引物(341F-GC/907R<sup>71</sup>)。第四,梯度凝胶及电泳条件也很难适合每种微生物的 DNA,致使不同菌的 DNA 扩增片段走到相同位置<sup>[18]</sup>。第五,近缘物种或菌株的 PCR 扩增 DNA 片段会形成嵌合体(chimera),变性梯度电泳时也可能形成异源双链体(heteroduplex),从而影响电泳分析 DNA 条带数目。因此,这些因素的综合使 DGGE 方法所得的结果只有相对的意义。尽管如此,比较纯培养法, DGGE 等分子生物学方法的应用使我们认识到,自然界确实存在大量值得发掘的未知微生物。方法学的问题需要不断改进,而且最好综合使用不同的分子生物学方法,才能使结果比较客观。

上述结果表明,青海盐湖确实存在大量的未知微生物。在本实验中,我们分离到的纯培养不足实际存在的 20%,而且基本都属于芽孢杆菌类型的微生物,绝大部分其它微生物未分离到纯培养,所鉴定的 12 个纯培养菌株,就有 5 个可能是新种,还有 1 个可能为新属,未知物种的比例确实很高!其它自然环境微生物群落的情况也类似,因而未培养微生物资源开发利用的前景非常广阔。从资源利用的角度出发,提出新思路,设计新的分离程序,尽可能从原始环境(尤其是原始处女极端环境)取样,尽可能多的分离未知微生物,是微生物资源开发利用的重要前提和关键之一。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 - 169.
- [ 2 ] Whitman W B, Coleman D C, Wiebe W J. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, **93**: 6578 - 6583.
- [ 3 ] Antranikian G, Aguilar A. First meeting on biotechnology of extremophiles. Hamburg: Technical University Hamburg-Harburg, 1993.
- [ 4 ] 姜成林,徐丽华. 微生物资源学. 北京: 科学出版社, 1997.
- [ 5 ] Edwards C. Environmental Monitoring of Bacteria. Totowa: Humana Press, 1999.
- [ 6 ] Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, **33**: 17 - 22.
- [ 7 ] Muyzer G, Waal E D De, Uitterlinden A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 695 - 700.
- [ 8 ] Ferris M J, Muyzer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**(2): 340 - 346.
- [ 9 ] Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, **16**: 313 - 340.
- [ 10 ] Kelly K L. Inter-Society Color-National Bureau of Standards Color-Name Charts Illustrated with Centroid Colors. Washington, DC: US Government Printing Office, 1964.
- [ 11 ] Brosius J, Palmer M L, Kennedy J P, et al. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1978, **75**: 4801 - 4805.
- [ 12 ] 韩志勇,沈革志,潘建伟. 一种改良的质粒 DNA 小量提取法. *生物技术通报*, 2000, **4**: 45 - 47.
- [ 13 ] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, **24**: 4876 - 4882.
- [ 14 ] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980, **16**: 111 - 120.
- [ 15 ] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406 - 425.
- [ 16 ] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, **39**: 783 - 791.
- [ 17 ] 张彭熹. 柴达木盆地盐湖. 北京: 科学出版社, 1987.
- [ 18 ] Sekiguchi H, Yomioka N, Nakahara T, et al. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters*, 2001, **23**: 1205 - 1208.

## Bacterial Diversity of Two Salt Lakes in Qinghai

CHAI Li-Hong CUI Xiao-Long PENG Qian XU Li-Hua JIANG Cheng-Lin\*

( Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education , Yunnan Institute of Microbiology , Yunnan University , Kunming 650091 , China )

**Abstract** : Bacterial diversities of salt lakes Chaka and Keke in Qinghai have been analyzed by using conventional cultivation methods and one culture-independent method ( DGGE ). Results showed that large amount of unknown microorganisms exist in these two lakes , isolated strains account for only a small portion of species diversity. Twelve isolates were identified with polyphasic taxonomic methods , and classified into five potential novel species and one new genus. Designing new strategies for isolation of as yet uncultured microorganisms from natural extreme environments is the key step to exploit microbial resources.

**Key words** Salt lake , Bacterial diversity , DGGE ( Denaturing gradient gel electrophoresis )

Foundation item : National Natural Science Foundation of China ( NSFC ) ( 30260004 , 30270004 )

\* Corresponding author. Tel 86-871-5034139 ; Fax 86-871-5173878 ; E-mail : lihxu@ynu.edu.cn xlcui@ynu.edu.cn

Received date 08-18-2003

## The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

### EDITOR-IN-CHIEF

LI Ji-Lun Academician

( College of Biology , Chinese Agricultural University , Beijing 100094 , China )

### VICE-EDITOR-IN-CHIEF

TAN Hua-Rong Professor

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

LU De-Ru Professor

( Institute of Genetics , Second Military Medical University , Shanghai 200433 , China )

WANG Ao-Quan Professor

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

QU Yin-Bo Professor

( School of Life Science , Shandong University , Jinan 250100 , China )

XU Jian-Guo Professor

( National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control , Chinese Center for Disease Control and Prevention , Beijing 102206 , China )

### MEMBERS OF THE BOARD

CAI Yong-Feng

CHEN Yong-Qing

CHENG Chi

DONG Xiu-Zhu

FAN Yun-Liu

GUO Jun

HU Fu-Quan

HU Yuan-Yang

HUANG Li

LU Cheng-Ping

MIN Hang

QIAN Shi-Jun

SHAO Yi-Ming

SHENG Jun

TANG Hong

TIEN Po

WANG Ping

WANG Hua-Ming ( USA )

XIE Hong

YANG Su-Sheng

ZHAI Zhong-He

ZHANG Yao-Ping ( USA )

ZHENG Tian-Ling

ZHU Bao-Quan

ZHUGE Jian

### MANAGING EDITORS

WANG Jin-Fang

WANG Min