

## 内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性的研究

潘海莲<sup>1,2</sup>, 周成<sup>1</sup>, 王红蕾<sup>1</sup>, 薛燕芬<sup>1\*</sup>, 马延和<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup> 中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘 要:** 从内蒙古锡林浩特地区 3 个不同的盐湖中共分离到 165 株古菌, 通过 ARDRA 分析后得到不同的类群, 从各个类群中随机选取 1~2 个代表菌株进行 16S rDNA 序列测定和系统发育的分析。结果表明分离的菌株分布在 *Halorubrum*, *Natronococcus*, *Natronorubrum*, *Haloterrigena*, *Halorhabdus*, *Halobiforma*, *Haloarcula*, *Haloferax* 8 个属和另外两个分支中, 表现了锡林浩特地区嗜盐古菌的多样性。部分菌株的 16S rDNA 序列同源性低于 97%, 可能是潜在的新属或新种, 代表了该地区嗜盐古菌的独特类型。

**关键词:** 盐湖; 嗜盐古菌; ARDRA; 16S rDNA

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)01-0001-06

嗜盐古菌(Extremely halophilic archaea)通常称为嗜盐菌(Halobacteria), 是嗜盐微生物的一大类群, 现在被划分为古菌域(Archaea)的嗜盐菌目(Halobacteriales)下的嗜盐菌科(Halobacteriaceae)。它们最显著的特征是对高浓度 NaCl 的依赖, 至少需要 1.5mol/L 的 NaCl 才能生长, 通常最适 NaCl 生长浓度为 3.5~4.5mol/L<sup>[1]</sup>。根据它们在 pH 条件下生长与否则分为中性嗜盐古菌和碱性嗜盐古菌两大类。目前所分离到的嗜盐古菌大多数来自高盐环境中, 如盐湖、盐碱湖、晒盐场、含盐浓度高的土壤、咸鱼和盐加工的毛皮、盐沉积物以及盐结晶体等。盐湖是自然界中一种高盐的水生生态环境, 生长着丰富的嗜盐微生物, 如真菌、细菌和古菌。在盐浓度超过 20% 的盐湖中, 嗜盐古菌成为该环境中的优势菌群<sup>[2]</sup>, 参与湖中多种物质的循环与能量的传递。由于嗜盐古菌在生物系统进化中的特殊地位使其成为研究生物进化的良好素材<sup>[3]</sup>; 另外, 其特殊的酶和其他大分子产物在医药行业、食品工业、环境整治和其它化学工业等方面都具有一定的应用潜力<sup>[4]</sup>。因此对于嗜盐古菌的研究从上世纪 80 年代起引起了微生物学家的关注。

目前为止, 嗜盐菌科中已经报道和描述的嗜盐菌共有 19 个属 63 个种。此外, 通过非培养的方法对盐湖嗜盐古菌的多样性和分布进行的研究表明嗜盐古菌的多样性比预想的还要丰富, 大多数嗜盐古

菌, 至今仍未通过培养方法得到<sup>[5~8]</sup>。

我国是个多盐湖的国家, 含有丰富的嗜盐微生物资源, 但现在对这些盐湖进行过生物学调查的却不足 50 个, 仍有大部分的盐湖环境有待探索。本文报道的是从内蒙古锡林浩特地区 3 个不同的盐湖中分离培养嗜盐古菌, 通过 16S rDNA 的限制性内切酶酶切片分析(ARDRA), 以及系统发育分析来揭示盐湖中嗜盐古菌的多样性, 从而了解盐湖的生态结构。同时, 对所获得的嗜盐古菌的生理生化和产酶特性做初步的分析, 为今后的开发和利用奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集和菌株分离:** 样品采自我国内蒙古锡林浩特地区 3 个盐湖: 上玛塔拉盐湖(SH), 二连诺尔盐湖(EN) 和一个未命名的盐湖(XH), 这 3 个盐湖在盐浓度和 pH 具有一定的差异。EN 湖是个中性湖, 盐浓度为 25%, pH 为 7.2; SH 是个偏碱性的盐湖, 盐浓度为 17%, pH 为 8.4; XH 是个盐碱湖, 盐浓度为 34%, pH 为 9.0。所有样品均用碱性和中性两种培养基进行培养。样品经稀释后涂布平皿, 在 37℃ 的温箱中光照培养 7~14d, 根据菌落大小, 形态, 颜色进行初步筛选分离并纯化。

**1.1.2 培养基:** 高度嗜盐菌培养基: 每升含 Casamino acids 5.0g, Yeast extract 5.0g, 柠檬酸三钠

基金项目: 国家 973 项目(2003CB716001)

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-10-82615925; E-mail: xueyf@sun.im.ac.cn

作者简介: 潘海莲(1978-), 女, 广西北海人, 硕士研究生, 主要从事盐湖嗜盐微生物多样性的研究。E-mail: hlpan@mails.gscas.ac.cn

收稿日期: 2005-06-22; 接受日期: 2005-07-11; 修回日期: 2005-08-19

3.0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  20g, KCl 2.0g, NaCl 200g,  $FeCl_2 \cdot 4H_2O$  36.0mg,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.36mg, Agar 15g。嗜盐碱菌培养基:每升含 Casamino acids 7.5g, Yeast extract 10g, 柠檬酸三钠 3.0g, KCl 2.0g,  $Fe^{2+}$  trace, NaCl 200g,  $Na_2CO_3$  10g, Agar 15g。每种培养基都增添 1% 的原湖水,以补充培养基的微量元素。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** DNA 快速纯化回收试剂盒购自天为时代公司,核酸测序由北京博亚公司完成。

## 1.2 生理生化试验

生理生化试验参照 Oren 等<sup>[9]</sup>1997 年发表的嗜盐菌新分类单位描述的最低标准以及 Ross 的方法。

## 1.3 16S rRNA 基因的扩增及 PCR 产物的 ARDRA 分析

**1.3.1 菌落 PCR 模板的制取:** 菌液划线,得到纯化的单菌落。牙签挑取单菌落,加到 1mL ddH<sub>2</sub>O 中,震荡,取 1 $\mu$ L 作 PCR 模板。

**1.3.2 16S rRNA 基因的扩增:** 正向引物 21f(5'-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3'),反向引物 1540r(5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3')。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}C$  5min;95 $^{\circ}C$  45s,50 $^{\circ}C$  45s,72 $^{\circ}C$  1min,30 个循环,72 $^{\circ}C$  10min。

**1.3.3 PCR 产物的纯化:** 使用试剂盒纯化 DNA。

**1.3.4 PCR 产物的限制性内切酶酶切:** 酶切反应体系为 15 $\mu$ L,其中 10 $\times$  Buffer 1.5 $\mu$ L,限制性内切酶 (*Afa* I 或 *Hae* III) 4U,PCR 产物 10 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 补充体系 15 $\mu$ L,混匀后置于 37 $^{\circ}C$  酶切 1h。取酶切产物 15 $\mu$ L 于 2.0% 琼脂糖凝胶,100V 电压下电泳 1h 后进行酶切带型的分析。

## 1.4 16S rRNA 基因扩增产物的测序

由北京博亚公司完成测序工作。

## 1.5 系统发育树的构件及分析

将所测定的 16S rDNA 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菌株的 16S rDNA 序列作为参比对象,再用 CLUSTAL X 软件进行多序列比对并计算供试菌株与参与菌株之间的序列相似性,通过 Treecnv(1.3b) 软件构建供试菌与参比菌之间的系统发育树。

# 2 结果

## 2.1 培养结果分析

从 3 个盐湖中分离得到 165 株嗜盐古菌,其中 EN 湖(66 株),XH 湖(51 株),SH 湖(48 株)。从 EN 湖分离到的菌株均为中性嗜盐菌,XH,SH 湖得到的

菌株有碱性嗜盐菌,耐碱嗜盐菌和中性嗜盐菌,表 1 为部分菌株的生理生化特征。

**2.1.1 菌落特征:** 在平板上表现为不同深浅的红色菌落,如粉红,桔红,亮红,紫红,深红。

**2.1.2 NaCl 生长浓度:** 从 15% ~ 25%,大多数在小于 10% 的 NaCl 浓度下不能生长;个别菌株在 8% 的 NaCl 浓度下可微弱生长。

**2.1.3 生长 pH:** 中性 EN 湖分离到的菌株其生长 pH 一般在 6.5 ~ 8.5 之间,个别菌株如 HEN27 和 HEN58 在 pH9.0 的条件下可微弱生长;盐碱湖 XH 和偏碱性湖 SH 分离到的菌株其 pH 生长范围在 6.5 ~ 11.0 之间,最适 pH 一般在 7.0 ~ 9.0 之间。

**2.1.4 对  $Mg^{2+}$  的需求:** 嗜盐碱菌对  $Mg^{2+}$  的需求很少,一般小于 5mmol/L。多数中性嗜盐菌株的最适  $Mg^{2+}$  一般在 50 ~ 200mmol/L 之间,在 500mmol/L 浓度的条件下不能生长或微弱生长。有 19 株菌株对  $Mg^{2+}$  有很强的耐受能力,可在 1000mmol/L  $Mg^{2+}$  以上生长,其中有 8 株菌株对  $Mg^{2+}$  的耐受能力达到 2000mmol/L。

**2.1.5 生长温度:** 大多数嗜盐古菌的最适温度在 40 $^{\circ}C$  以上,生长温度在 20 $^{\circ}C$  ~ 60 $^{\circ}C$  之间。个别菌株为微嗜热菌,最适生长温度为 50 $^{\circ}C$ ,在 60 $^{\circ}C$  的条件下长势也很好。

**2.1.6 产酶能力:** 从 165 株嗜盐古菌中经过筛选得到产蛋白酶菌株 5 株,淀粉酶 24 株,酯酶 44 株。

## 2.2 ARDRA 分析

纯化后的菌株使用古菌通用的引物进行其 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 产物用限制性内切酶 (*Afa* I 或 *Hae* III) 进行酶切分析。根据酶切图谱,EN 湖包括 8 个类型,SH 湖包括 13 个类型,XH 湖分为 12 个类型,显示了内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性的丰富。

## 2.3 系统发育分析

根据前面的 ARDRA 分析结果,选取其中的 25 株菌株进行其 16S rDNA 序列的测定,然后在 GenBank 等数据库中进行相似性的搜索,选定其中同源性较高的相关菌株并与之构建成系统发育树(图 1)。从系统发育树来看,从内蒙古盐湖分离到的嗜盐古菌分布在 *Halorubrum*、*Natronococcus*、*Natronorubrum*、*Haloterrigena*、*Halorhabdus*、*Halobiforma*、*Haloarcula*、*Haloferax* 等 8 个属以及两个独立的分支中。从两个偏碱性的盐湖中分离到 10 株嗜盐碱古菌,划分为 *Natronorubrum* 和 *Natronococcus* 两个属,其中以 SHSA28 和 SHSA30 为代表的菌株与 *Natronorubrum*

JOURNALS.IM.AC.CN

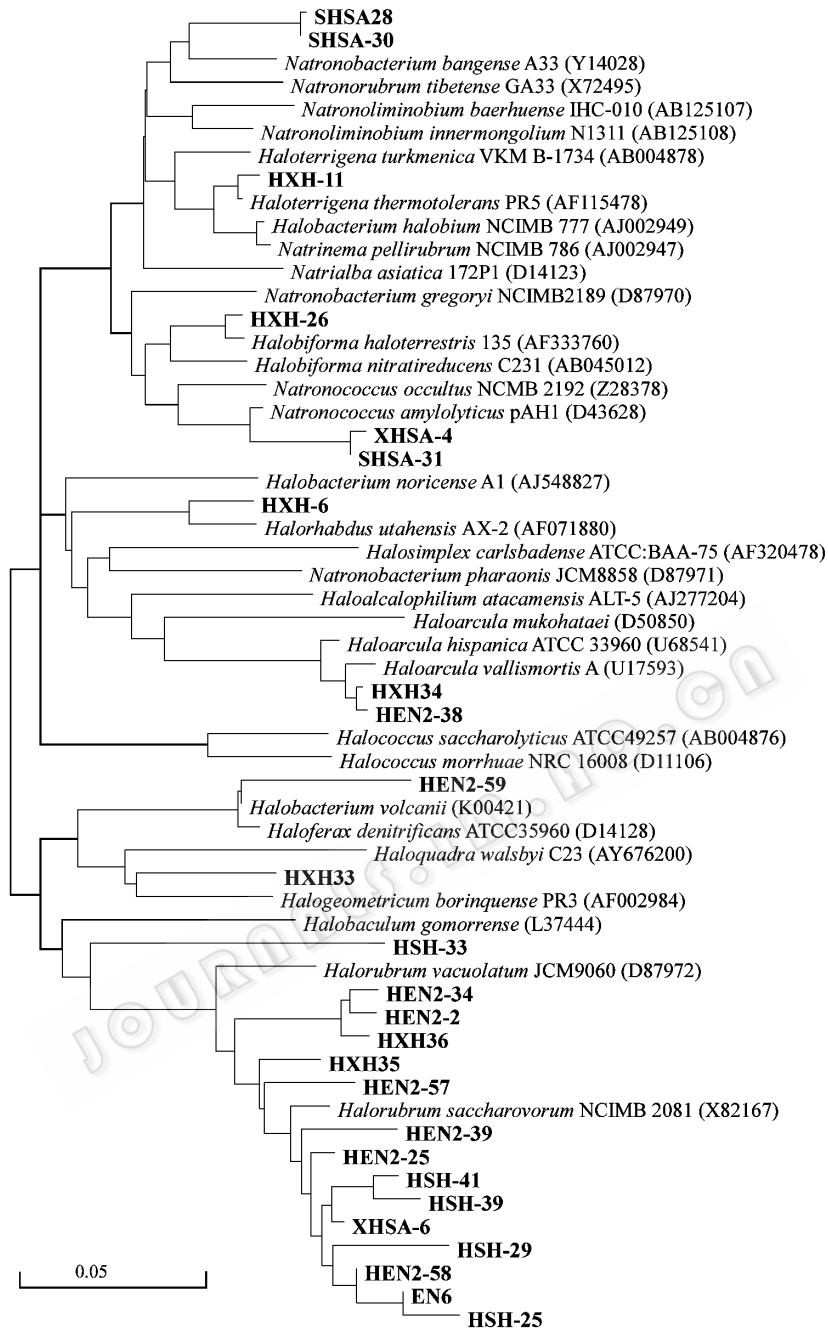


图 1 内蒙古锡林浩特地区盐湖的嗜盐古菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the isolates and their relatives in *Halobacteriaceae*

The bold represents the representatives of the isolates. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Bar, 5% sequence divergence.

*tibetense* 的相似性为 99% ,以 XHSA4 和 SHSA31 为代表的菌株与 *Natronococcus amylolyticus* 相似性为 98% ,但在生理生化特性上与所报道的 *Natronococcus amylolyticus* 有较大的差别,因此有可能成为该属的新种。中性嗜盐古菌包括 *Halorubrum* , *Haloterrigena* , *Halorhabdus* , *Halobiforma* , *Haloarcula* , *Haloferax* 等属。*Halorubrum* 属的菌株所占的比例比较大,有 14 株菌,但其 16S rDNA 在种的水平上具有

很大的差异,其中 5 株与 *Halorubrum vacuolatum* 相似性较高(相似性范围为 97% ~ 98% ),11 株与 *Halorubrum saccharovororum* 相似性较高(相似性范围为 95 ~ 97% ),为 *Halorubrum* 属潜在的新种。HXH34 和 HEN38 与 *Haloarcula Vallismortis* 相似性较高(98% ),HEN59 与 *Haloferax volcanii* 相似性较高(98% ),HXH11 与 *Haloterrigena thermotolerans* 相似性较高(98% ),HXH26 与 *Halobiforma haloterrestris* 相似

性较高(98%)。HXH6与*Halorhabdus utahensis*相似性为96%,目前*Halorhabdus*属仅有一个种,只分离到一株菌,是从美国犹他州大盐湖<sup>[10]</sup>分离到的,从系统进化分析的结果来看,HXH6应独立成为该属的一个新种。从XH湖分离到的HXH33与*Halogeometricum borinquense*相似性较为接近(93%),在分类关系上与*Halogeometricum*属并列,可独立成为一个新属。从SH湖分离到的HSH33菌株,与*Halogeometricum borinquense*相似性为89%,在古菌系统发育树上形成独立的分支,与已知的古菌有着较远的亲缘关系,也将独立成为一个新属。此外,该菌株与从南极(Vestfold Hills, Eastern Antarctica)高盐海岸盆地沉积泥样得到的非培养克隆子Deep-5<sup>[11]</sup>的相似性为96%,表明了该属的菌株可能分布在比较广泛的高盐生态环境中。

### 3 讨论

嗜盐古菌是盐湖生态系统重要的组成之一。对盐湖嗜盐古菌多样性研究比较深入的是死海,东非的Magadi盐碱湖,还有一些日光盐湖<sup>[12]</sup>。死海是唯一研究时间最长,最为深入的高盐环境。在过去的30年里,科学家对其中生长的微生物做了大量的研究工作。从死海分离到的嗜盐古菌包括*Haloferax volcanii*, *Haloarcula marismortui*, *Halorubrum sodomense*, 和*Halobaculum gomorrhense*<sup>[13]</sup>等。饱和盐浓度,pH10的Lake Magadi也是一个备受关注的高盐环境,从中分离到的微生物主要为嗜盐碱古菌类群,包括*Natronobacterium gregoryi*, *Natrialba magadii*, *Halorubrum vacuolatum*, *Natronococcus occultus*等<sup>[14]</sup>。我国对嗜盐古菌的研究始于80年代,目前从西藏,内蒙古,新疆等地区的盐湖分离到9个嗜盐古菌新种,但对嗜盐古菌多样性进行系统的研究还是比较少,范华鹏等人对西藏扎布耶茶卡湖的嗜盐古菌多样性进行过非培养的研究<sup>[15]</sup>。

本次研究工作中通过分离培养的方法,共获得了10个类群的菌株,初步揭示了内蒙古锡林浩特地区盐湖的嗜盐古菌具有丰富的多样性。范等人对西藏扎布耶茶卡湖的非培养研究中得到8个嗜盐古菌属的类群。内蒙古锡林浩特地区的盐湖和西藏扎布耶茶卡湖进行比较,可以发现两个地区的盐湖中都包括*Halorubrum*、*Natronococcus*、*Natronorubrum*、*Haloterrigena*和*Halorhacudus*属的嗜盐古菌,而且与*Halorubrum*属相近的克隆序列或菌株从数量上都占较大的比例,可能代表这些地区湖中嗜盐古菌的优

势菌群,反映了两个地区的盐碱湖中微生物在种类上具有一定的相似性。在碱性的XH湖中分离到的*Haloarcula*属菌株,在扎布耶茶卡湖的非培养研究中不见报道。在死海分离到*Haloarcula*、*Haloferax*和*Halorubrum*属的菌株在我们研究的EN湖中也得到了纯培养。

虽然分子生态学的方法为我们研究和揭示微生物多样性得到了极大的拓展,但是要了解微生物在生物圈行使的生态功能,仍需要得到它们的纯培养,因此分离培养的工作仍然是研究微生物多样性一个不可缺少的手段。本次研究中,我们分离到两个新属的菌株,其中HXH33和HSH33菌株在培养基中比其他菌株生长缓慢,说明现使用的培养基都不适合它们的生长,这可能是在以往的培养中没有获得该菌株的原因。今后对这两株菌株的生理特性和生态功能的进一步研究,将会对于我们了解盐湖生态系统有着重要的意义。

在本次研究工作中,我们对25株嗜盐古菌的16S rDNA序列进行了测序,其中有10余株菌株的同源性低于97%,从系统进化分析的结果来看,它们可能为潜在的新种或新属,这既反映了内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性具有自己的独特性,并表明了该地区盐湖中仍有许多尚未被分离培养的微生物。此外,我们还筛选到多株产淀粉酶、蛋白酶和酯酶的菌株,这说明我国盐湖的嗜盐微生物可为工业酶提供宝贵的资源。

### 参 考 文 献

- [1] Oren A. Halophilic Microorganisms and Their Environments. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [2] Kamekura M. Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles*, 1998, 2(3): 289-295.
- [3] Cavicchioli R. Extremophiles and the search for extraterrestrial life. *Astrobiology*, 2002, 2: 281-292.
- [4] Mellado ME, Antonio V. Biotechnological Potential of Moderately and Extremely Halophilic Microorganisms. In: José-Luis Barredo. Microorganisms for health care, food and enzyme production. Trivandrum India: Research Signpost, 2003, 233-256.
- [5] Cytryn E, Minz D, Oremland RS, et al. Distribution and Diversity of a hypersaline stratified lake. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66: 3269-3276.
- [6] Grant S, Grant WD, Jones BE, et al. Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. *Extremophiles*, 1999, 3: 139-145.
- [7] Bowman JP, McCammon SA, Rea SM, et al. The microbial composition of three limnologically disparate hypersaline Antarctic lakes. *FFMS Microbiol Lett*, 2000, 183: 81-88.

- [ 8 ] Burns DG , Camakaris HM , Janssen PH , *et al.* Combined use of cultivation-dependent and cultivation-independent methods indicates that members of most Haloarchaeal Groups in Australian crystallizere pond are cultivable. *Appl Environ Microbiol* , 2004 , 70(9) :5258 – 5265.
- [ 9 ] Oren A , Ventosa A , Grant WD. Proposed minimal standards for description of new taxa in the Order Halobacteriales. *Int J Syst Bacteriol* , 1997 , 47 : 233 – 238.
- [ 10 ] Waino M , Tindall BJ , Ingvorsen K. *Halorhabdus utahensis* gen. nov. , sp. nov. , an aerobic , extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake , Utah. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2000 , 50 : 183 – 190.
- [ 11 ] Bowman JP , Rea SM , McCammon SA , *et al.* Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin , Vestfold Hils , Eastern Antarctica. *Environ Microbiol* , 2000 , 2(2) : 227 – 237.
- [ 12 ] Aharon O. The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiology Reviews* , 1994 , 13 : 415 – 440.
- [ 13 ] Ventosa A , Arahal DR. Microbial life in the Dead Sea. In : Seckbach J. ed. Enigmatic microorganisms and life in Extreme Environments. Netherlands : Kluwer Academic Publishers , 1999 : 357 – 368.
- [ 14 ] Aharon O. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* , 2002 , 39 : 1 – 7.
- [ 15 ] 范华鹏 薛燕芬 马延和 等. 西藏扎布耶茶卡盐湖古菌多样性的非培养技术分析. *微生物学报* 2003 , 43(4) : 401 – 408.

## Diversity of Halophilic Archaea in Hypersaline lakes of Inner Mongolia , China

PAN Hai-lian<sup>1,2</sup> , ZHOU Cheng<sup>1</sup> , WANG Hong-lei<sup>1</sup> , XUE Yan-fen<sup>1\*</sup> , MA Yan-he<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

(<sup>2</sup> Graduate School of the Chinese Academy of Sciences , Beijing 100049 , China )

**Abstract :** The aims of this work were to explore the diversity of halophilic archaea in hypersaline lakes of Inner Mongolia , China and to collect novel halophilic archaea. One hundred and sixty-five halophilic archaea were isolated from the three different types of hypersaline lakes ( Erliannor , Shangmatale and Xilin soda lake ) in Inner Mongolia. By analysis of the restriction patterns of amplified 16S rDNA ( ARDRA ) with the enzyme *Afa* I and *Hae* III , respectively , the isolates were clustered into 14 genotypes , and the representatives of each genotype were randomly chosen for the determination of 16S rDNA sequence. The phylogenetic analysis revealed that all of the isolates were clustered into 10 groups : *Halorubrum* , *Natronococcus* , *Natronorubrum* , *Haloterrigena* , *Halorhabdus* , *Halobiforma* , *Haloarcula* , *Haloferax* and other two unknown groups. Dominant isolates were related to *Halorubrum* spp. in all three lakes. Some of the isolates studied showed less affiliation with known taxa ( < 98% sequence similarity ) and may represent novel taxa. Two isolates HXH33 and HSH33 showed very less affiliation with known genus ( < 93% sequence similarity ) and may represent two new genera. These results suggest that diverse archaea exist in and the unknown archaea thrive in the hypersaline lakes of Inner Mongolia.

**Keywords :** Hypersaline lake ; Halophilic archaea ; Diversity