

## 昆明盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌多样性研究

肖 炜<sup>1</sup> 杨亚玲<sup>3</sup> 刘宏伟<sup>1</sup> 文孟良<sup>1</sup> 崔晓龙<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 云南大学 云南省微生物研究所 云南省生物资源保护与利用重点实验室 昆明 650091)

(<sup>2</sup> 云南盐化股份有限公司 昆明 650011)

(<sup>3</sup> 昆明理工大学生物与化学工程学院 昆明 650224)

(<sup>4</sup> 云南大学生命科学实验教学中心 昆明 650091)

**摘 要:** 为了了解昆明盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌的多样性, 用 MBA 和 ISP2 分离和培养了昆明盐矿卤水和盐晶中的细菌 44 株。发现盐晶中的可培养好氧细胞数量( $3.1 \times 10^3 \sim 3.7 \times 10^6$  CFU/g) 远远高于卤水中的数量( $1.3 \sim 6.3 \times 10^3$  CFU/L)。分离所得纯培养物的 16S rDNA 序列系统发育分析结果表明 44 株菌可分为 4 大类群 34 个不同的分类单元(16S rDNA 序列相似性大于 97% 为同一分类单元)。24 株属于厚壁菌门(Firmicutes, 54.6%) 2 株属于变形菌门  $\alpha$  亚群( $\alpha$ -Proterbacteria, 4.6%) 4 株属于变形菌门  $\gamma$  亚群( $\gamma$ -Proterbacteria, 9.1%), 14 株属于放线细菌门(Actinobacteria, 31.7%)。卤水和盐晶中的优势菌都是 *Bacillus* 属菌(26.1% 和 59.9%)。据 16S rDNA 序列相似性分析发现 7 株菌为可能的新种或属。此外, 还筛选到 7 株抗菌活性菌株。研究表明, 昆明盐矿古老岩盐沉积中, 不仅含有较为丰富的微生物物种多样性, 并且存在许多未被认识的新物种和生物活性菌株, 为古老岩盐沉积中微生物的深入研究奠定了基础。

**关键词:** 可培养细菌; 多样性; 古老岩盐沉积; 昆明盐矿

**中图分类号:** Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2006)06-0967-06

目前, 很多研究者认为由于大量未培养微生物的存在, 应用纯培养技术不能准确反映环境中微生物的多样性。因此, 近 20 年来对微生物多样性的分析从纯培养技术转向了基于 16S rDNA 序列的免培养分析法, 这类方法的应用, 使人们发现了很多新的未培养微生物类群<sup>[1]</sup>。但免培养分析法也存在诸多不可忽视的局限性, 如不易获取环境样品中所有微生物的 DNA、不易同时等量 PCR 扩增各类微生物的 16S rDNA 等。另外, 仅根据 16S rDNA 序列相似性, 并不能很准确地确定微生物的分类地位。微生物只有得到纯培养并结合其它特征分析后才能确定其分类地位, 未培养微生物尤其如此<sup>[2]</sup>。因此, 纯培养方法仍然是分类学、生态学、生理学, 以及次生代谢产物化学研究的有效方法。

地下盐层等高盐环境与普通环境相比被认为具有较低的原核生物多样性。然而, 这里仍含有相当多样的嗜盐菌和耐盐菌<sup>[3,4]</sup>。近年来, 国际上对高盐环境微生物的研究方兴未艾。国际微生物分类学权威刊物 IJSEM(International Journal of Systematic and

Evolutionary Microbiology) 近五年来发表的有关嗜盐菌的论文达 141 篇, 并呈逐年上升趋势, 2005 年达到了 52 篇, 这些嗜盐菌大多分离自盐湖、盐碱土、海洋、晒盐池等环境。但只有少量研究描述从地下盐层中分离嗜盐菌和耐盐菌<sup>[3,4]</sup>, 其中, Vreeland 等<sup>[5]</sup>于 2000 年在 *Nature* 发表文章, 指出其从二叠纪原始盐晶中分离到一株 2.5 亿年前的耐盐菌, 并由此引发了生物学家激烈的讨论。这些研究将对长期以来关于古老岩盐沉积中生物的起源与进化等问题提供重要证据。

对极端环境微生物的研究不仅使人类得以了解和探索生命的策略和极限, 而且为超常物质(如 *Taq* DNA Polymerase)的开发利用提供了资源。高盐环境微生物之所以引发了微生物学家极大的研究热情也正因为其在相容性溶质、表面活性剂、水解酶、胞外多糖、PHB 等的产生方面具有巨大的应用潜力<sup>[6]</sup>。由于微生物容易操作、具有独特的交叉反应并在地球生存历史悠久, 我们可以将其作为阐明生态和生物进化原理的模式, 探讨和认识高盐环境下生物的

基金项目: 国家自然科学基金(30460004, 30360004, 30660004); 云南省自然科学基金重点项目(2004C0002Z); 云南省中青年学术带头人后备人才基金(2005PY10-1); 教育部留学回国人员启动基金; 云南省教育厅基金项目(5Y0199B)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-871-5034621; E-mail: xlcui@ynu.edu.cn

作者简介: 肖 炜(1979-) 男, 云南人, 现为中山大学博士研究生。E-mail: xiaow313@yahoo.com.cn

其他作者: 段东成<sup>2</sup>, 陈 维<sup>2</sup>, 彭 谦<sup>1</sup>, 陈义光<sup>1</sup>, 邓 岚<sup>1</sup>, 李沁元<sup>4</sup>, 王治刚<sup>1</sup>, 任 祺<sup>1</sup>, 徐丽华<sup>1</sup>

收稿日期: 2006-01-17; 接受日期: 2006-02-28; 修回日期: 2006-04-26

起源、生物进化的速率、历史、模式,以及它们的适应方式、机制等重要理论。因此,微生物在古老岩盐沉积中的存在、分布和数量等问题同样值得研究。

昆明盐矿地处云贵高原,采用定向对接钻井水溶采卤的方式生产卤水,年产卤水 100 万 m<sup>3</sup>,是滇中地区重要的制盐基地。其盐层属上侏罗统含盐地层,盐层距地表面 300 ~ 760m。国内对古老岩盐沉积微生物多样性的系统研究工作尚未见报道,本研究报道了昆明盐矿可培养细菌的多样性,以期为古老岩盐沉积微生物的深入研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品的采集** 2005 年 1 月至 3 月,样品采自昆明盐矿(北纬 24°57',东经 102°35')。卤水样品采自 3 个卤水沉淀池卤水进水口,带回实验室经 0.22μm 滤膜(Millipore 公司)过滤收集菌体,置无菌培养皿 4℃保存。盐晶样品(沉积物)采自 3 个卤水沉淀池底部,由无菌三角瓶带回实验室,所有样品 24h 内处理。

**1.1.2 培养基:** MBA(marine broth agar, Difco 公司); ISP(葡萄糖 4g/L,麦芽膏 5g/L,酵母膏 4g/L, pH7.2)

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 0.22μm 滤膜(Millipore 公司); PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品; Taq DNA Polymerase 等扩增所用试剂为宝生物工程(大连)有限公司产品;厌氧罐(BBL GasPak Anaerobic Systems)。

### 1.2 培养物分离计数

3 个样点的样品混合后进行分离。用无菌卤水将滤膜上的菌洗下分别稀释涂布于 MBA 和 ISP,盐晶直接稀释涂布于 MBA 和 ISP 培养基。培养基分别含 NaCl 3, 5, 10, 15, 20%(W/V)。28℃倒置培养 7 ~ 28d 后进行数量统计。纯化后的菌种制备甘油管 -70℃冻存。厌氧培养:涂布后的培养皿(含 NaCl 15%)倒置厌氧培养,28℃,35d 后进行数量统计。

### 1.3 培养物 DNA 提取和 16S rDNA PCR 扩增

根据文献[7]提供的方法提取培养物基因组 DNA 后 PCR 扩增 16S rDNA。细菌引物 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1541r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'<sup>[8]</sup>。PCR 反应体系和反应条件参照文献[9]进行。

### 1.4 16S rDNA 部分序列分析

扩增的 PCR 产物送宝生物工程(大连)有限公司纯化并测序。测定的序列用 BLAST 程序在 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库中进行相似性搜索,从中获取相近的典型菌株 16S rDNA 序列,

用 ClustalX 按照最大同源性的原则进行排序,采用 Kimura-2<sup>[10]</sup> 计算核苷酸差异值,并用 BioEdit 5.0.9 进行检验,最后用 Neighbor-Joining 法<sup>[11]</sup> 构建系统进化树,自展数(bootstrap)为 1000。以 16S rDNA 相似性小于 97% 定义为不同分类单元。

## 2 结果和讨论

### 2.1 样品特征

卤水 pH6.5, 盐度 24 波美度(°Bé)(相当于含盐量约 307g/L,达盐水饱和浓度),温度 15℃。主要金属离子: Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Li<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 等<sup>[12]</sup>。

### 2.2 卤水和盐晶中培养物计数和分离

利用 MBA 和 ISP2 培养基对昆明盐矿卤水和盐晶样品进行分离,共获得 44 株异养型好氧和兼性厌氧菌。不同样品所得菌落数有明显差异(表 1)。盐晶中获得的菌落数明显高于卤水中所得菌落数。这主要因为当培养基中 NaCl 浓度大于和等于 10% (W/V) 时,对盐晶进行分离的平皿上出现了大量生长缓慢的红色菌落,其数量最多时占平皿中总菌落数的 95%。我们使用 500μL 卤水直接进行涂布分离而未获得任何菌落也证明卤水中可培养的菌很少。从培养基来看,两种培养基上的菌落数没有明显的差异,但 MBA 平皿上的菌落颜色单一,多为黄色或灰白色,而 ISP2 上菌落颜色较多样。这可能因为 ISP2 的有机物较 MBA 丰富的缘故。另外,两种培养基上的厌氧菌落数相当,而盐晶中的厌氧菌略高于卤水中的,但与好氧菌相比颜色更为单一,基本为白色菌落。

表 1 卤水和盐晶中细菌数量的计数结果

Table 1 Bacterial populations of brines and sediments		
ISP2 and MBA (NaCl/%)	CFU	
	Brines (L <sup>-1</sup> )	Sediments (g <sup>-1</sup> )
3	4.5 × 10 <sup>3</sup> /5.9 × 10 <sup>3</sup>	3.1 × 10 <sup>3</sup> /2.3 × 10 <sup>4</sup>
5	6.3 × 10 <sup>3</sup> /6.1 × 10 <sup>3</sup>	7.2 × 10 <sup>3</sup> /3.4 × 10 <sup>4</sup>
10	5.2 × 10 <sup>3</sup> /5.5 × 10 <sup>3</sup>	2.1 × 10 <sup>6</sup> /3.0 × 10 <sup>6</sup>
15	3.3 × 10 <sup>3</sup> /2.0 × 10 <sup>3</sup>	3.0 × 10 <sup>6</sup> /2.0 × 10 <sup>6</sup>
20	2.4 × 10 <sup>3</sup> /1.3 × 10 <sup>3</sup>	2.8 × 10 <sup>6</sup> /3.7 × 10 <sup>6</sup>
A. strains*	1.6 × 10 <sup>2</sup> /2.1 × 10 <sup>2</sup>	7.1 × 10 <sup>2</sup> /8.5 × 10 <sup>2</sup>

\* anaerobic strains.

### 2.3 系统发育分析

对 44 株分离物的 16S rDNA 进行序列测定共得到 44 条有效序列(GenBank 序列号为:DQ358644 - DQ358687)。经 16S rDNA 序列相似性分析(表 2)发现,卤水中分离到 13 个属的菌,盐晶中分离到 6 个属的菌,只有 *Bacillus* 属的菌同时分离于卤水和盐晶样品。

表 2 分离菌株 16S rDNA 序列相似性分析

Table 2 Analysis of partial 16S rDNA sequences of isolates from the Kunming Salt Mine

Brines				Sediments			
Nearest related genus	No. of isolates	Identity/ %	Growing in salt rang/ %	Nearest related genus	No. of isolates	Identity/ %	Growing in salt rang/ %
<i>Bacillus</i>	6	98 ~ 100	0 ~ 20	<i>Bacillus</i>	13	98 ~ 100	0 ~ 20
<i>Paracoccus</i>	1	100	0 ~ 6	<i>Filobacillus</i>	1	97	0 ~ 20
<i>Virgibacillus</i>	1	100	0 ~ 7	<i>Halomonas</i>	4	96 ~ 98	0 ~ 20
<i>Jeotgalibacillus</i>	1	100	2 ~ 15	<i>Halobacillus</i>	1	99	0 ~ 10
<i>Microbacterium</i>	2	99	2 ~ 5	<i>Oceanobacillus</i>	1	96	0 ~ 5
<i>Rathayibacter</i>	2	99	0 ~ 5	<i>Kocuria</i>	1	99	2 ~ 10
<i>Arthrobacter</i>	2	96 ~ 98	0 ~ 4				
<i>Arsenicicoccus</i>	2	100	0 ~ 5				
<i>Brevundimonas</i>	1	98	0 ~ 5				
<i>Nocardiopsis</i>	1	99	0 ~ 10				
<i>Streptomyces</i>	2	96 ~ 99	0 ~ 5				
<i>Cellulomonas</i>	1	98	0 ~ 10				
* unidentified	1	96	0 ~ 10				
Total	23			Total	21		

基于 16S rDNA 序列的系统发育分析结果( 图 1 ) 表明 , 所得的 44 条有效序列可分为 4 大类群 34 个不同的分类单元。24 株属于厚壁菌门( Firmicutes , 54.6% ) 2 株属于变形菌门  $\alpha$  亚群(  $\alpha$ -Proterbacteria , 4.6% ) 4 株属于变形菌门  $\gamma$  亚群(  $\gamma$ -Proterbacteria , 9.1% ) , 14 株属于放线细菌门( Actinobacteria , 31.7% )。

Firmicutes 类群在盐晶和卤水中都占有最高的比例 , 该类群所有菌株分属 *Bacillaceae* 科中的 6 个属 , 其中以 *Bacillus* 属最多( 19 株 )。19 株菌中 YIM-KMY10 与 *Bacillus pumilus*( ATCC 7061<sup>T</sup> ) 的相似性为 98%。YIM-DKMY67 以 99% 相似于分离自美国地下 896 米处的一株未培养细菌。YIM-KMY30 与分离自内蒙古盐碱湖一株未知菌相似性达 99%。其余 16 株菌与现有菌株的相似性为 99% ~ 100%。YIM-DKMY57 菌落呈灰白色与分离自希腊海滨的 *Filobacillus milensis*( DSM 13259<sup>T</sup> )<sup>[13]</sup> 相似性为 97%。YIM-DH3 以 96% 的相似性与 *Oceanobacillus iheyensis* ( CM 11309<sup>T</sup> ) 和 *Oceanobacillus oncorhynchi* ( CM 12661<sup>T</sup> ) 聚在一起 , 对其分类地位的研究正在进行中。

$\gamma$ -Proterbacteria 类群的 4 株菌 YIM-DKMY60 , YIM-DKMY56 , YIM-DKMY25 , YIM-DY3 都属于 *Halomonas* 属。YIM-DY3 是一株兼性厌氧菌 , 与分离于韩国海产品的中度嗜盐菌 *H. alimentaria*( DSM 15356<sup>T</sup> )<sup>[14]</sup> 相似性为 98% , *H. alimentaria* 的最适生长 NaCl 浓度为 1% ~ 13%( W/V )。YIM-DKMY60 与 *H. campisalis*( ATCC 700597<sup>T</sup> ) 和 *H. desiderata*( DSM 9502<sup>T</sup> ) 相似性 96% , 通过生理生化实验我们已经确认其为一新种 , 将在近期发表。

$\alpha$ -Proterbacteria 类群含 YIM-KMY1 和 YIM-KMY42-2 两株菌。YIM-KMY1 可以认为是 *Paracoccus marcusii*( DSM 11574<sup>T</sup> ) 相似性 100% , YIM-KMY42-2 与 *Brevundimonas bacteroides* ( DSM 4726<sup>T</sup> ) 虽然有 98% 的相似性 , 但在抗生素敏感性 , 水解酶活性 , 碳源利用等方面都有不同 , 可能是一个新类群。

Actinobacteria 类群包括 14 株菌 , 其中 13 株由卤水中分离到 , 只有与 *Kocuria carniphila*( CCM 132<sup>T</sup> ) 相似的 YIM-DKMY51( 相似性 99% ) 由盐晶分离到。YIM-KMY48 是 *Streptomyces* 的一种 , 对黑曲霉 , 藤黄八叠球菌和藤黄微球菌具有抗性 , 值得做进一步的研究。

另外 , 我们获得一株分类地位难以确定的桔黄色分离物( YIM-KMY41 ) , 虽然与现有的菌株有 96% 的相似性 , 但在生理生化等方面都有较大差异 , 可能是一个新属。我们还从 44 株菌中筛选到 7 株具有抗菌活性的菌株 , 占有菌株的 15.9%。

3 结论

研究发现<sup>[3,15,16]</sup> , 嗜盐古菌是高盐环境中的优势菌群。我们在对昆明盐矿古老岩盐沉积的研究中除获得 44 株细菌外 , 在对平皿中出现的大量红色菌落的分析中 , 还分离了 2 株古菌 , 它们都属于 *Halorubrum* 属。本研究未发现丰富的古菌群落 , 一方面表明古菌难以使用传统的培养基和培养方法分离 , 另一方面也说明细菌也是高盐环境微生物的重要组成部分。Josefa 等<sup>[16]</sup> 的研究也证明了这一点。所以 , 对嗜盐细菌的研究有助于我们全面了解高盐环境生物多样性。

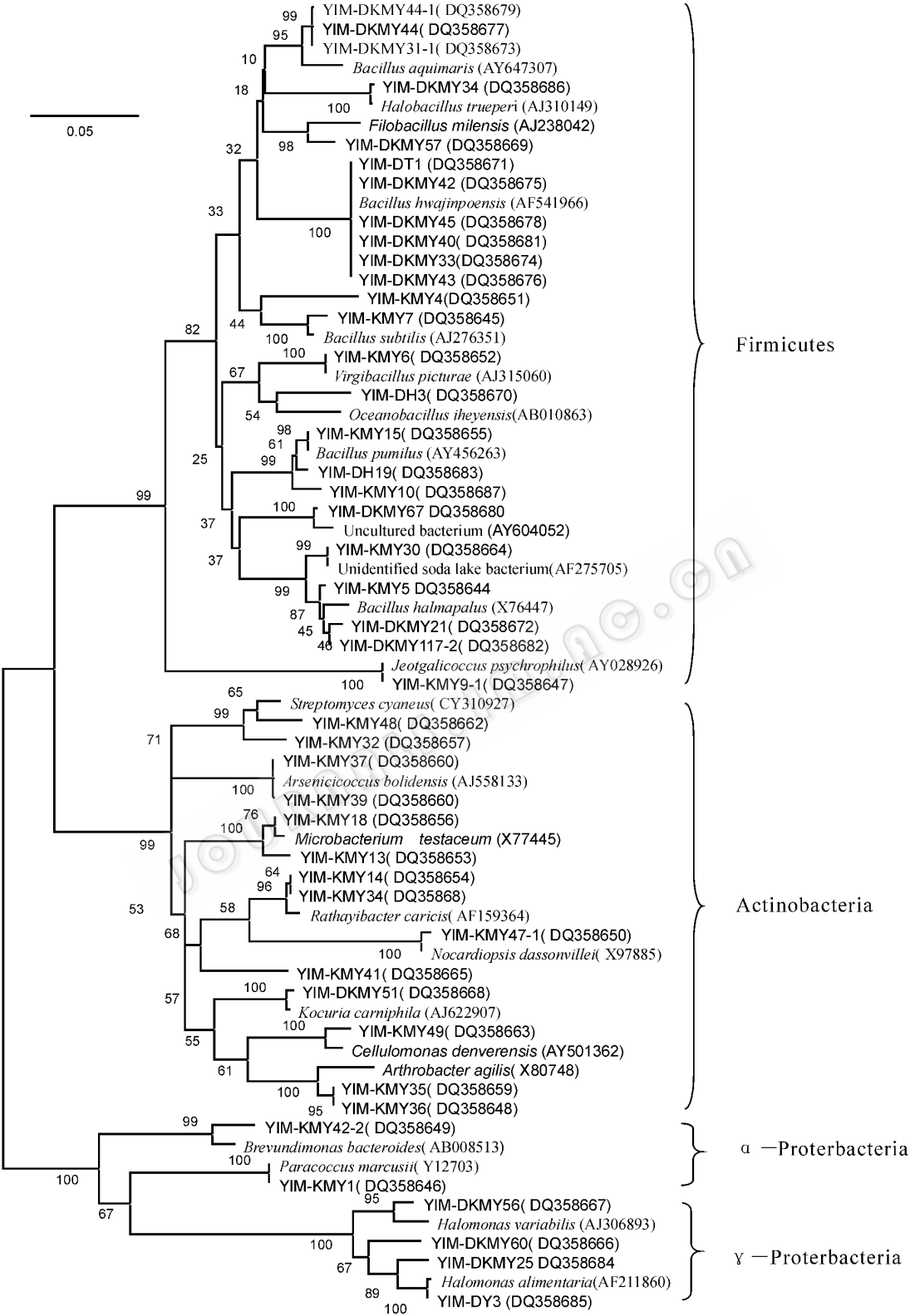


图 1 昆明盐矿分离细菌的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig.1 Dendrogram for strains isolated from the Kunming Salt Mine based on partial 16S rRNA gene sequences. Data in parentheses are the GenBank accession numbers and the number of isolates represented by this strain. The scale bar indicates 5 substitutions per 100 nucleotides of 16S rDNA sequence. Bootstrap values were showed on the branches.

本研究获得了 14 株放线细菌,其中包括稀有放线细菌 *Kocuria* 和 *Cellulomonas*,这是其它盐环境<sup>[1,16,17]</sup>所不常分离到的。这与我们使用了适合放线菌生长的 ISP2 培养基并于 28℃ 培养有关。其中的某些菌株只能生长于 NaCl 浓度 0~7%(W/V)之间,推测其耐盐性与培养温度和培养基成分有关<sup>[6]</sup>,也反映出这些菌对盐度广泛的适应能力(或许它们是以休眠状态存在于高盐环境中)。此外,高盐环境微生物的耐盐性并不与其所生长的环境盐浓度直接相关,非耐盐菌也可能是高盐环境的原生菌。当然,这些菌也可能是灌入地下溶解盐层的地下水中的原有菌,其实质有待进一步研究。

在使用纯培养方法进行分析时,Firmicutes 和  $\gamma$ -Proterbacteria 是晒盐池和海底沉积物等样品中的优势类群,Yeon 等使用 MBA 对韩国某晒盐池的分离中只获得这两大类群<sup>[1]</sup>,但  $\gamma$ -Proterbacteria 亚群所包含的菌株分属五个科。我们的研究中该类群只含有一个属,有可能是因昆明盐矿中该类群确实单一,也可能在淘汰冗余菌株时抛弃了那些菌株。Lee 等人<sup>[18]</sup>的研究结果显示  $\alpha$ -Proterbacteria 是海水中的优势类群,其次才是  $\gamma$ -Proterbacteria。我们的研究中  $\alpha$ -Proterbacteria 只含有两株菌,其原因同样值得探讨。在用免培养对海水和盐碱土等高盐环境进行研究时,芽孢菌并不是其中的优势菌,而我们的研究中芽孢菌却成为优势菌,这提示芽孢菌在高盐环境中可能多以芽孢形式存在。当然,芽孢菌是否是昆明盐矿中的优势菌还需要结合免培养法的分析才能得出客观的结论。

使用荧光原位杂交等方法时,盐矿中卤水或盐晶中的细胞数可高达  $4.0 \times 10^7$  cell/mL,但使用纯培养进行计数时其菌落数却相差较大(从 0 到  $1 \times 10^6$  不等)<sup>[17]</sup>。这当然与所使用的培养方法不同有关,也与不同盐矿金属离子、形成年代以及受人为影响程度等因素造成的微生物区系差异有关。本研究卤水中的菌落数( $1.3 \sim 6.3 \times 10^3$  CFU/L)低于 Yeon 等使用 MBA 培养基对韩国某晒盐池的分离数( $3 \sim 7 \times 10^5$  CFU/L),而盐晶中的分离数( $3.7 \times 10^6$  CFU/g)却又远高于 Vreeland 对新墨西哥一盐矿的分离数( $1.0 \times 10^4$  CFU/g)<sup>[19]</sup>。

虽然免培养技术能对微生物的多样性作出较全面而准确的评价,但本研究仍对多样性的分析提供了有价值的信息。这些获得的纯培养物不仅可用于生理学的研究,也可与免培养分析方法所获得的结果进行比较研究,以获得更准确的评价。这项工作

我们已在进行中。

2005 年 12 月 Science 在对 2006 年的科学展望中认为环境微生物研究将是 2006 年的十大研究热点之一<sup>[20]</sup>。微生物是一群以分解代谢为主的重要生物类群,其生物学多样性十分丰富。但由于它们的微观性,尤其原核微生物简单的单细胞结构、以无性方式繁殖而造成的无准确的基线对其进行种群数目和数量的统计,因而对微生物的多样性研究远没有宏观生物那样深入和受到重视<sup>[21]</sup>。而目前对极端环境微生物多样性的认识更为有限,这些环境中的超常微生物所包含的超常物质将是未来生物资源开发的热点。所以从资源利用的角度来看,提出新思路,设计新的分离程序,尽可能从原始极端环境取样,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<sup>[22]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Yeon SH, Jeong WJ, Park JS. The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *J Microbiol*, 2005, **43**(1): 1-10.
- [2] 刘志恒,姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术. 北京:科学出版社,2004.
- [3] Vreeland RH, Hochstein LI. The Biology of Halophilic Bacteria. ed. Boca Raton: CRC Press, 1993.
- [4] Oren A. Halophilic Microorganisms and their Environment. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- [5] Vreeland RH, Rosenzweig WD, Powers DW. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature*, 2000, **407**: 897-900.
- [6] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(2): 504-544.
- [7] Rainey FA, Naomi WR, Kroppenstedt RM. et al. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, **46**: 1088-1092.
- [8] Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, et al. Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1981, **148**: 107-127.
- [9] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2001.
- [10] 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.
- [11] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406-425.
- [12] 云南省地方志编纂委员会. 云南省志(卷十九,盐业志). 昆明:云南人民出版社,1993.

- [ 13 ] Schlesner H , Lawson PA , Collins MD. *Filobacillus milensis* gen. nov. , sp. nov. , a new halophilic spore-forming bacterium with Om-D-Glu-type peptidoglycan. *Int J Syst Evol Microbiol* ,2001 , **51** :425 – 431.
- [ 14 ] Yoon JH , Lee KC , Kho YH , *et al.* *Halomonas alimentaria* sp. nov. , isolated from jeotgal , a traditional Korean fermented seafood , *Int J Syst Evol Microbiol* ,2002 , **52** :123 – 130.
- [ 15 ] Oren A. Diversity of halophilic microorganisms : Environments , phylogeny , physiology , and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* ,2002 , **28** :56 – 63.
- [ 16 ] Josefa A , Ramon RM , Francisco RGV , *et al.* Extremely halophilic bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* ,2000 , **66** ( 7 ) :3052 – 3057.
- [ 17 ] McGenity TJ , Gemmell RT , Grant WD , *et al.* Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol* ,2000 , **2** ( 3 ) :243 – 250.
- [ 18 ] Lee JH , Shin HH , Lee DS , *et al.* Bacterial diversity of culturable isolates from seawater and marine coral , *Plexauridae* sp. , near Mun-Sum , Cheju-Island. *J Microbiol* ,1999 , **37** :193 – 199.
- [ 19 ] Vreeland RH , Piselli AFJ , McDonnough S , *et al.* Distribution and diversity of halophilic bacteria in a subsurface salt formation. *Extremophiles* ,1998 , **2** ( 3 ) :321 – 331.
- [ 20 ] Science editor. Areas to Watch in 2006. *Science* ,2005 , **310** :1885.
- [ 21 ] 东秀珠 ,洪俊华. 原核微生物的多样性. 生物多样性 ,2001 , **9** ( 1 ) :18 – 24.
- [ 22 ] 柴丽红 ,崔晓龙 ,彭 谦 ,等. 青海两盐湖细菌多样性研究. 微生物学报 ,2004 , **44** ( 3 ) :271 – 275.

## Culturable bacterial diversity of the ancient salt deposits in the Kunming Salt Mine , P. R. China

XIAO Wei<sup>1</sup> , YANG Ya-ling<sup>3</sup> , LIU Hong-wei<sup>1</sup> , WEN Meng-liang<sup>1</sup> , CUI Xiao-long<sup>1\*</sup>

( <sup>1</sup> Yunnan Institute of Microbiology and Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources , Yunnan University , Kunming 650011 , China )

( <sup>2</sup> Yunnan Salt & Chemical Industry Co. , Ltd. , Kunming 650011 , China )

( <sup>3</sup> Department of Biologic and Chemical Engineering , Kunming University of Science and Technology , Kunming 650224 , China )

( <sup>4</sup> Experiment Center of Life Science , Yunnan University , Kunming 650091 , China )

**Abstract** :In order to understand the diversity of culturable bacteria ,44 bacteria strains inhabiting brines and salt crystals in the Kunming Salt Mine , P. R. China were isolated and cultured. Results showed that the numbers of the bacteria isolated from salt crystals (  $3.1 \times 10^3 \sim 3.7 \times 10^6$  CFU/g ) were higher than those from brines (  $1.3 \sim 6.3 \times 10^3$  CFU/L ). A neighbor-joining tree of the partial 16S rDNA sequences ( about 600bp of 5'-end ) showed that 44 strains were phylogenetically clustered into 4 major groups and 44 distinct lineages or species ( the similarities of 16S rDNA sequences < 97% ) :24 strains of Firmicutes ( 54.6% ) , 2 strains of  $\alpha$ -Proteobacteria ( 4.6% ) , 4 strains of  $\gamma$ -Proteobacteria ( 9.1% ) and 14 strains of Actinobacteria ( 31.7% ). Strains of the genus *Bacillus* ( 26.1% and 59.9% ) were the most predominant microorganisms among brines and salt crystals. Additionally , seven potential novel species were found , based on the similarities of 16S rDNA sequences to those of previously published species , and seven strains with bioactivities against pathogenic microorganisms were isolated. The conclusion is that there are a number of novel species and bioactive strains , as well as great diversity in Kunming Salt Mine.

**Keywords** : Culturable bacteria ; Bacterial diversity ; Ancient salt deposits ; Kunming Salt Mine

Foundation item : Chinese Natural Science Foundation ( 30460004 , 30360004 , 30660004 ) ; Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars of the State Education Ministry ; Yunnan Provincial Sciences and Technology Department ( 2005PY01-1 , 2004C0002Z )

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-871-5034621 ; E-mail : xlcui@ynu.edu.cn

Other authors : DUAN Dong-cheng<sup>2</sup> , CHEN Wei<sup>2</sup> , PENG Qian<sup>1</sup> , CHEN Yi-guang<sup>1</sup> , DENG Lan<sup>1</sup> , LI Qin-yuan<sup>4</sup> , WANG Zhi-gang<sup>1</sup> , REN Zhen<sup>1</sup> , XU Li-hua<sup>1</sup>

Received :17 January 2006/Accepted 28 February 2006/Revised 26 April 2006