

## 小溪自然保护区非盐环境土壤中嗜盐和耐盐菌多样性

陈奇辉<sup>1</sup>, 刘祝祥<sup>1</sup>, 彭清忠<sup>1</sup>, 黄苛<sup>1</sup>, 贺建武<sup>1</sup>, 张丽<sup>1</sup>, 李文均<sup>2</sup>, 陈义光<sup>\*</sup>

(<sup>1</sup> 吉首大学生物资源与环境科学学院, 吉首 416000)

(<sup>2</sup> 云南大学, 云南省微生物研究所, 教育部微生物多样性可持续利用重点实验室, 昆明 650091)

**摘要:**【目的】研究湖南小溪国家级自然保护区普通非盐环境(ordinary non-saline environment)土壤样品中可培养嗜盐及耐盐细菌(含放线菌)多样性。【方法】采用纯培养法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对样品中嗜盐及耐盐细菌多样性进行研究。【结果】用补充 5% -20% (w/v) NaCl 的 MA、ISP 2、ISP 5、NA 和 HAA 培养基从土壤样品中分离到 114 株细菌, 其中 8 株为中度嗜盐菌, 19 株为轻度嗜盐菌, 87 株为耐盐菌。根据形态观察和部分生理生化实验结果去冗余, 选取 61 个代表性菌株进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析。结果表明, 这些菌株属于细菌域(Bacteria)的 3 个大的系统发育类群(门; phylum)(Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria)的 16 个科、18 个属, 代表了 41 个物种。多数菌株属于 Firmicutes 门(38 株, 62.3%)和 Actinobacteria 门(18 株, 29.5%)。大多数菌株与其系统发育关系最密切的已知物种的典型菌株之间存在一定的遗传差异(16S rRNA 基因序列相似性为 96.9% -99.8%), 其中有 7 个菌株(JSM 070026, JSM 081004, JSM 081006, JSM 081008, JSM 083058, JSM 083085, JSM 084035)代表 7 个潜在新种(potential novel species)。【结论】研究结果表明, 湖南小溪国家级自然保护区普通非盐环境土壤中存在较为丰富的可培养嗜盐及耐盐细菌多样性, 并且潜藏着较多新的微生物类群(物种)。

**关键词:** 普通非盐土壤; 嗜盐和耐盐细菌; 纯培养法; 16S rRNA 基因序列; 系统发育分析

**中图分类号:** Q939      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1452-08

全球存在大量的盐环境(saline environment), 如海洋、盐湖、盐滩、晒盐场、盐渍土壤以及地下岩盐和卤水, 其中分布着丰富多样的嗜盐或耐盐微生物类群<sup>[1-2]</sup>。近年来, 国内外学者从盐环境土壤中分离到了大量的嗜盐和耐盐细菌(含放线菌)<sup>[3-5]</sup>。人们对嗜盐和耐盐菌潜在的生物技术方面的应用充满了兴趣, 目前主要集中在对它们产生的生物活性物质、大分子多聚物以及它们在生物环保中应用等方面<sup>[6-9]</sup>。由于嗜盐及耐盐菌对盐浓度有较大的耐受范围, 环境温度和营养条件对它们耐受的盐浓度也有不同程度的影响, 因而在全球盐环境范围内这

类微生物有着广泛的分布<sup>[9]</sup>。然而, Echigo 等<sup>[10]</sup>在日本东京周边地区的果园、草坪、牧场和林地等普通非盐环境(ordinary non-saline environment)土壤中分离到 176 株能耐受 20% (w/v) NaCl 的芽孢杆菌科(Bacillaceae)嗜盐或耐盐细菌, 并发现其中有 15 个代表潜在新类群(potential novel taxa)<sup>[11-13]</sup>。这些结果表明嗜盐及耐盐微生物在普通非盐环境中也有分布。Echigo 等<sup>[10]</sup>也初步探讨了这些菌株的起源, 认为它们是中国内陆盐环境中的细菌芽孢通过沙尘暴传播到日本的。那么, 这些非盐环境中的嗜盐及耐盐微生物究竟是土著物种而是外来物种, 是如何

**基金项目:** 国家自然科学基金(30970007); 国际合作重大项目(2007DFB31620); 吉首大学项目(09JDY022)

**\* 通信作者:** Tel: +86-743-8564416; Fax: +86-743-8565323; E-mail: mchenjsu@yahoo.com.cn

**作者简介:** 陈奇辉(1986-), 男, 湖南新化人, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源与生态。E-mail: chenqihui\_808@163.com

**收稿日期:** 2010-04-10; **修回日期:** 2010-05-10

起源的,其进化演替规律是怎样的?它们在全球非盐环境中是否普遍分布,类群和物种多样性如何?这些微生物有什么适应非盐环境的特殊机制?这些问题值得深入研究。

湖南小溪国家级自然保护区(28°42′15″–28°53′15″ N,110°6′50″–110°21′35″ E)地处云贵高原和鄂西山地向沅、麻盆地倾斜带东缘的武陵山脉中段,土壤为板页岩发育的山地黄红壤,pH值平均为6.0。本课题组近年来对该保护区开展了一系列的微生物资源调查研究工作,本文报道了采用纯培养法和基于16S rRNA基因序列的系统发育分析方法对该区域内普通非盐环境土样中嗜盐及耐盐菌多样性的研究结果,以期普通非盐环境中嗜盐及耐盐微生物资源的深入研究提供一定实验依据和理论指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要仪器和试剂:**PCR仪购自BIO-RAD公司(PE-9600);微波消解仪购自CEM公司(CEM-Mars);电感耦合等离子质谱仪(ICP-MS)购自安捷伦科技公司(Agilent 7500);细菌基因组DNA提取和纯化、16S rRNA基因PCR扩增所用酶、引物和试剂同文献[14]。

**1.1.2 培养基:**营养琼脂(nutrient agar;NA)、ISP 2琼脂和ISP 5琼脂(ISP: International *Streptomyces* Projects)按文献[15]配制;MA(marine agar 2216)培养基购自Difco公司;腐植酸琼脂(humic acid agar;HAA):腐植酸10.0 g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g,KCl 1.7 g,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g,CaCl<sub>2</sub> 1.0 g,水1000 mL,琼脂20.0 g,pH 7.5。

### 1.2 样品采集与处理

2007年4月,从湖南小溪国家级自然保护区的果园、稻田、沙土和森林等普通非盐环境的5 cm–20 cm土层共采集68份土样。样品装入无菌聚乙烯袋中,4°C保存,带回实验室后24 h内处理。各土样进行微波消解后,采用电感耦合等离子体质谱法<sup>[16]</sup>测定NaCl的含量,均低于0.1% (w/w)。

### 1.3 菌株分离

以MA、ISP 2、ISP 5、NA和HAA等琼脂培养基作为分离基础培养基,添加25 mg/L制霉菌素抑制真菌,制成分别含5%、10%、15%和20% (w/v)

NaCl的系列平板。土壤样品分果园、稻田、沙土和森林等四类,混合均匀、充分研磨,然后各称取10 g土样置于盛有90 mL 0.85% (w/v)无菌盐水和玻璃珠的500 mL三角瓶中,在摇床上120 r/min振荡2 h,制得土样悬液,然后用0.85% (w/v)无菌盐水做10倍梯度稀释。取0.2 mL一定浓度的土壤样品稀释液涂布平板,于28°C培养。7–28 d后进行菌落计数,挑取单菌落用相应的培养基进行四分体划线纯化。所得纯培养物制成冻干牛奶管,同时接种于相应的斜面培养基,保藏于4°C备用。

### 1.4 基于16S rRNA基因序列的系统发育多样性分析

基因组DNA提取、16S rRNA基因PCR扩增、PCR产物纯化和序列测定按Cui等<sup>[17]</sup>使用的方法进行。扩增和测序用一对细菌通用引物:正向引物PA(8–27f;5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和反向引物PB(1523–1504r;5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′)。所得序列提交GenBank注册,获取序列号(accession number)。然后用Blast搜索程序从GenBank/EMBL/DDBJ等公共数据库中调出相似性较高的相关菌株的16S rRNA基因序列,用CLUSTAL\_X软件进行序列多重比对,系统进化距离矩阵根据Kimura模型估算,用MEGA 4.0(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件包采用邻接法(neighbour-joining method)进行聚类分析和系统进化树构建,重复取样1000次进行自展值(Bootstrap value)分析以评估系统进化树的拓扑结构稳定性<sup>[18]</sup>。

### 1.5 Shannon-winner多样性指数

本文采用16S rRNA基因序列相似性小于97%的菌株属于不同物种的归类原则<sup>[19]</sup>,采用Shannon-winner指数( $H$ )和均匀度指数( $E$ )估算多样性<sup>[20]</sup>。

$$H = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i;$$

$$E = H/\ln S;$$

式中 $S$ 为菌种数; $P_i$ 为第 $i$ 种的多度比例; $P_i = n_i/N$ ;  $n_i$ 是第 $i$ 种的菌株数; $N$ 是所有菌株数的总和。

### 1.6 生物学特征

用添加不同浓度[% (w/v);0,2,5,8,10,15,20,25]NaCl的NA琼脂平板测定菌株对NaCl的耐受性;形态特征、生理生化特征等实验按文献[21]所用方法进行。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株的分离

根据菌落大小、形态、颜色等特征,挑取分离平板上的单菌落进行四分体划线纯化,最终从本次采集的样品中分离到 114 株细菌(含放线菌)菌株。分离平板上嗜盐及耐盐菌数量在  $0 - 10^5$  cfu/g 之间,且表现为:森林土 > 稻田土 > 果园土 > 沙土。从不同培养基分离效果来看,MA 分离到的菌落最多,菌落形态较丰富,而 ISP 5 菌落形成单位最少,且菌

落形态单一。各培养基在添加 5% (w/v) NaCl 时出菌率最高、菌落形态多样性较丰富;超过 15% (w/v) NaCl 时出菌率均显著下降,而在添加 20% NaCl 的培养基上只有少数平板有少量细小菌落形成。根据 Kushner 关于嗜盐及耐盐菌归类原则<sup>[22]</sup>,盐浓度耐受实验结果表明,分离菌株中 8 株为中度嗜盐菌 (moderately halophilic bacteria), 19 株为轻度嗜盐菌 (slightly halophilic bacteria), 87 株为耐盐菌 (halotolerant bacteria) (见表 1 和表 2)。

表 1 分离自不同类型土样中的嗜盐及耐盐菌统计表

Table 1 Statistics of isolates from non-saline soil samples

Sampling site	Moderately halophilic bacteria	Slight halophilic bacteria	Halotolerant bacteria	Total
Non-saline forest	2	10	35	47
Non-saline garden	3	4	18	25
Non-saline paddyfield	3	5	25	33
Non-saline sand	0	0	9	9
Total	8	19	87	114

### 2.2 类群多样性

通过比较菌落形态、细胞显微形态及 NaCl 耐受实验等实验结果,去掉部分冗余菌株,从 114 个分离菌株中选取 61 个代表性菌株进行基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析。结果表明,这些菌株具有较高的类群多样性,61 个代表菌株分属于细菌域 (Bacteria) 的 3 个系统发育类群 (门; phylum) (Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria) 的 16 个科 (Alteromonadaceae, Bacillaceae, Brevibacteriaceae, Chromatiaceae, Dermabacteraceae, Enterobacteriaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Nocardiaceae, Planococcaceae, Pseudomonadaceae, Sphingomonadaceae, Staphylococcaceae, Streptomycetaceae, Thermomonosporaceae, Yaniellaceae)、18 个属 (*Actinomadura*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brachy bacterium*, *Brevibacterium*, *Erwinia*, *Halobacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Microbacterium*, *Microbulbifer*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Yaniella*)。多数菌株属于 Firmicutes 门 (38 株, 62.3%), 其中芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 菌株有 33 株 (54.1%), 为优势科, 而 *Bacillus* 属 (29 株; 47.5%) 为优势属; 其次是 Actinobacteria 门 (18 株, 29.5%) 和 Proteobacteria 门 (5 株, 8.2%) (表 2)。系统发育分析结果表明, 8 个中度嗜盐菌菌株 (JSM 070026, JSM 081002, JSM

081010, JSM 081003, JSM 081008, JSM 081015, JSM 081026, JSM 083035) 也具有较高的类群多样性, 分属于产芽孢的革兰氏阳性菌的 3 个属 (*Bacillus*, *Halobacillus*, *Jeotgalibacillus*)、不产芽孢的革兰氏阳性菌 *Yaniella* 属和革兰氏阴性菌 *Microbulbifer* 属 (表 2)。

### 2.3 物种与遗传多样性

按 16S rRNA 基因序列相似性小于 97% 的菌株属于不同物种的归类原则<sup>[19]</sup>, 61 株用于系统发育多样性分析的分离菌株可以归入 41 个不同物种 (表 2), Shannon-winner 多样性指数 ( $H$ ) 为 3.4968, 均匀度指数 ( $E$ ) 为 0.9416, 表明湖南小溪国家级自然保护区普通非盐环境土壤中可培养嗜盐及耐盐菌具有较高的物种多样性和均匀度。除了 10 株分别与其相关的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 100% 外, 其它分离菌株与其相关的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列相似性在 96.9% - 99.8% 之间 (表 2), 说明大部分菌株与其系统发育关系最密切的相关已知物种典型菌株之间存在较大的遗传差异。

值得指出的是, 61 个菌株中有 7 株与其系统发育关系最密切的已知物种的典型菌株的 16S rRNA 基因序列或表型特征存在较大差异 (表 2 和图 1 中菌号加粗的菌株)。其中 JSM 081006 与 *Bacillus marisflavi* TF-11<sup>T</sup> 系统发育关系最密切 (图 1), 它们

表 2 小溪国家级自然保护区嗜盐及耐盐菌与其系统发育关系最密切的典型菌株间的系统发育关系

Table 2 Phylogenetic closest neighbors of halophilic and halotolerant bacteria isolated from Xiaoxi National

Natural Reserve as determined by 16S rRNA gene sequence analysis

Phylum/Family	Strain (accession number) *	Closest type strain (accession number)	Similarity/%	NaCl range (optimum)/%
<b>Actinobacteria (18/61)</b>				
	JSM 081041 (HM054453)	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048 <sup>T</sup> (X76564)	100	0–20 (0–2)
Brevibacteriaceae (3)	JSM 081045 (HM054454)	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048 <sup>T</sup> (X76564)	99.7	0–15 (0)
	JSM 081046 (HM054455)	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048 <sup>T</sup> (X76564)	99.5	0–20 (0–2)
Dermabacteraceae (1)	JSM 082044 (HM054504)	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> LMG 19861 <sup>T</sup> (AJ415377)	100	0–15 (0–2)
Microbacteriaceae (1)	JSM 082020 (HM054456)	<i>Microbacterium paraoxydans</i> CF36 <sup>T</sup> (AJ491806)	99.3	0–5 (0)
	JSM 081031 (HM054457)	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> DSM 420 <sup>T</sup> (X80743)	98.3	0–8 (0)
	JSM 081044 (HM054458)	<i>Arthrobacter rhombi</i> F. 98. 3HR. 69 <sup>T</sup> (Y15885)	98.0	0–15 (0)
Micrococcaceae (5)	JSM 082002 (HM054459)	<i>Arthrobacter humicola</i> KV-653 <sup>T</sup> (AB279890)	99.7	0–8 (0)
	JSM 082018 (HM054501)	<i>Arthrobacter humicola</i> KV-653 <sup>T</sup> (AB279890)	99.7	0–8 (0)
	JSM 082038-1 (HM054460)	<i>Arthrobacter defluvi</i> 4C1-a <sup>T</sup> (AM409361)	98.5	0–5 (0)
	JSM 082046 (HM054461)	<i>Nocardia elegans</i> IMMIB N-402 <sup>T</sup> (AJ854057)	100	0–5 (0)
Nocardiaceae (3)	JSM 082050 (HM054462)	<i>Nocardia elegans</i> IMMIB N-402 <sup>T</sup> (AJ854057)	100	0–5 (0)
	JSM 082010 (HM054463)	<i>Rhodococcus qingshengii</i> djl-6 <sup>T</sup> (DQ090961)	100	0–15 (0)
	JSM 082030 (HM054503)	<i>Streptomyces chrestomyceticus</i> DSM 40545 <sup>T</sup> (AJ621609)	100	0–10 (0)
Streptomycetaceae (3)	JSM 082054 (HM054464)	<i>Streptomyces resistomycificus</i> NBRC 12814 <sup>T</sup> (AB184166)	98.5	0–5 (0)
	JSM 082087 (HM054465)	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> JCM 6918 <sup>T</sup> (AY999752)	99.6	0–10 (0–5)
Thermomonosporaceae (1)	JSM 082016 (HM054466)	<i>Actinomadura latina</i> DSM 43382 <sup>T</sup> (AY035998)	98.0	0–5 (0)
Yaniellaceae (1)	<b>JSM 070026 (FJ524720)</b>	<i>Yaniella flava</i> YIM 70178 <sup>T</sup> (AY684123)	99.4	0–20 (5–8)
<b>Firmicutes (38/61)</b>				
	JSM 082014 (HM054467)	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup> (AJ831844)	100	0–20 (0–5)
	JSM 082021-1 (HM054502)	<i>Bacillus aerophilus</i> 28K <sup>T</sup> (AJ831844)	100	0–20 (0–2)
	JSM 082081-1 (HM054507)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ATCC 23350 <sup>T</sup> (X60605)	99.5	0–10 (0)
	JSM 082080 (HM054506)	<i>Bacillus clausii</i> DSM 8716 <sup>T</sup> (X76440)	99.7	0–15 (0–2)
	JSM 082091 (HM054469)	<i>Bacillus clausii</i> DSM 8716 <sup>T</sup> (X76440)	99.5	0–15 (0–2)
	JSM 081002 (HM054470)	<i>Bacillus firmus</i> NCIMB 9366 <sup>T</sup> (X60616)	99.4	0–10 (5–8)
	JSM 081010 (HM054471)	<i>Bacillus firmus</i> NCIMB 9366 <sup>T</sup> (X60616)	99.0	0–15 (5–8)
	JSM 082076 (HM054472)	<i>Bacillus horneckiae</i> 1P01SC <sup>T</sup> (EU861362)	99.8	0–20 (0)
	JSM 081003 (HM054473)	<i>Bacillus lehensis</i> MLB-2 <sup>T</sup> (AY793550)	99.5	0–15 (5–8)
	<b>JSM 081004 (HM054474)</b>	<i>Bacillus lehensis</i> MLB-2 <sup>T</sup> (AY793550)	97.8	0–15 (2–5)
	JSM 082097 (HM054508)	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 <sup>T</sup> (CP000002)	99.8	0–20 (0)
	JSM 081037 (FJ524722)	<i>Bacillus rigui</i> WPCB074 <sup>T</sup> (EU939689)	100	0–15 (0–5)
	JSM 081005 (HM054475)	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11 <sup>T</sup> (AF483624)	97.9	0–15 (0)
	JSM 081035 (HM054476)	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11 <sup>T</sup> (AF483624)	99.1	0–15 (0)
	<b>JSM 081006 (HM054477)</b>	<i>Bacillus marisflavi</i> TF-11 <sup>T</sup> (AF483624)	96.9	0–15 (0)
	JSM 081022 (HM054478)	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 <sup>T</sup> (D16273)	99.3	0–15 (0)
Bacillaceae (33)	JSM 081043 (HM054479)	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 <sup>T</sup> (D16273)	99.2	0–20 (0)
	JSM 081047 (HM054480)	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 <sup>T</sup> (D16273)	98.9	0–15 (0)
	JSM 081049 (HM054500)	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 <sup>T</sup> (D16273)	99.2	0–20 (0)
	JSM 081050 (HM054481)	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 <sup>T</sup> (D16273)	99.3	0–20 (0–2)
	JSM 082008 (HM054482)	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 <sup>T</sup> (D16273)	99.1	0–10 (0–2)
	JSM 082040 (HM054483)	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 <sup>T</sup> (D16273)	99.4	0–20 (0–5)
	JSM 082107 (HM054484)	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 <sup>T</sup> (D16273)	99.5	0–20 (0–5)
	JSM 082108 (HM054485)	<i>Bacillus megaterium</i> IAM 13418 <sup>T</sup> (D16273)	99.4	0–20 (0)
	JSM 081015 (HM054486)	<i>Bacillus patagoniensis</i> PAT 05 <sup>T</sup> (AY258614)	98.4	0–15 (5–10)
	JSM 082056 (HM054505)	<i>Bacillus pumilus</i> DSM 27 <sup>T</sup> (AY456263)	99.8	0–20 (0–2)
	JSM 081051 (HM054487)	<i>Bacillus sralis</i> 171544 <sup>T</sup> (AF071856)	97.6	0–15 (0–2)
	JSM 081023 (HM054488)	<i>Bacillus stratosphericus</i> 41KF2a <sup>T</sup> (AJ831841)	99.3	0–15 (0–5)

续表 2

Phylum/Family	Strain (accession number) *	Closest type strain (accession number)	Similarity/%	NaCl range (optimum) /%
<b>Actinobacteria (18/61)</b>				
	JSM 081014 (HM054489)	<i>Bacillus vietnamensis</i> 15-1 <sup>T</sup> (AB099708)	98.1	0–20 (0–2)
	JSM 081016 (HM054490)	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> FP5 <sup>T</sup> (AM295006)	97.5	0–20 (2)
	JSM 081007 (HM054491)	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> FP5 <sup>T</sup> (AM295006)	97.8	0–20 (2–5)
	JSM 081026 (HM054492)	<i>Halobacillus dabanensis</i> D-8 <sup>T</sup> (AY351395)	98.2	0–20 (5–8)
	JSM 082052 (HM054493)	<i>Halobacillus kuroshimensis</i> IS-Hb7 <sup>T</sup> (AB195680)	99.8	0–15 (2)
Planococcaceae (1)	<b>JSM 081008 (FJ524721)</b>	<i>Jeotgalibacillus alimentarius</i> YKJ-13 <sup>T</sup> (AF281158)	99.4	0–20 (5–8)
	JSM 082037 (HM054494)	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i> RP29 <sup>T</sup> (AF527483)	99.5	0–20 (0–5)
	JSM 082074 (HM054495)	<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ATCC 29974 <sup>T</sup> (D83361)	99.8	0–20 (0)
Staphylococcaceae (4)	JSM 082089 (HM054496)	<i>Staphylococcus urealyticum</i> ATCC 49330 <sup>T</sup> (AB009936)	99.7	0–20 (0–5)
	JSM 081052 (HM054497)	<i>Staphylococcus urealyticum</i> ATCC 49330 <sup>T</sup> (AB009936)	99.1	0–20 (0)
<b>Proteobacteria (5/61)</b>				
Alteromonadaceae (1)	<b>JSM 084035 (FJ524719)</b>	<i>Microbulbifer donghaiensis</i> CN85 <sup>T</sup> (EU365694)	97.1	2–10 (5–8)
Chromatiaceae (1)	<b>JSM 083085 (FJ524718)</b>	<i>Rheinheimera pacifica</i> KMM 1406 <sup>T</sup> (AB073132)	98.6	1–10 (2)
Enterobacteriaceae (1)	JSM 082100 (HM054498)	<i>Erwinia rhapontici</i> ATCC 29283 <sup>T</sup> (U80206)	99.0	0–5 (0)
Pseudomonadaceae (1)	JSM 082092-2 (HM054499)	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> C36 <sup>T</sup> (AJ575816)	100	0–8 (0–2)
Sphingomonadaceae (1)	<b>JSM 083058 (FJ524717)</b>	<i>Sphingomonas aestuarii</i> K4 <sup>T</sup> (EF660755)	99.2	0–5 (0)

\* Strains marked in bold refer to potential new taxa.

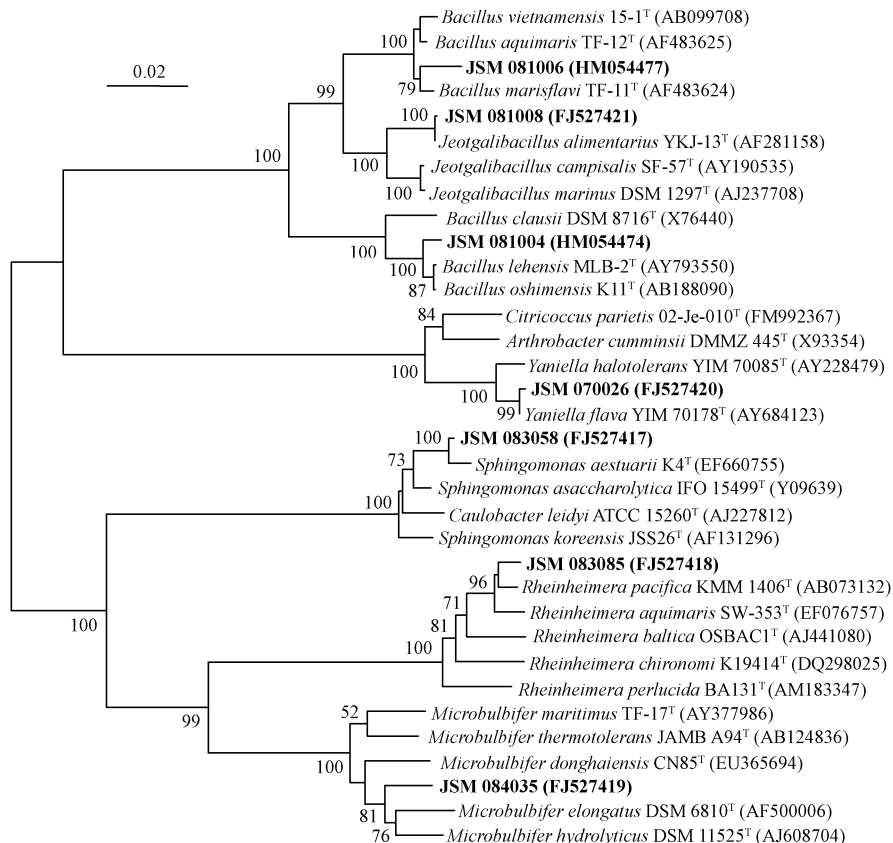


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的 7 个代表潜在新类群菌株的系统发育树

Fig. 1 Neighbor-Joining tree constructed based on 16S rRNA gene sequence analysis showing the phylogenetic relationships among 7 strains (potential new taxa) isolated from non-saline soil collected from Xiaoxi National Natural Reserve and their closely related taxa. Numbers at nodes indicate bootstrap values (>50%) based on a neighbor-joining analysis of 1000 resampled datasets. Bar, 2 substitutions per 100 nucleotides.

之间的 16S rRNA 基因序列相似性分别为 96.9%, 可能代表了 *Bacillus* 属的新物种; 菌株 JSM 070026、JSM 081004、JSM 081008、JSM 083058、JSM 083085 和 JSM 084035 分别与其系统发育关系最密切的典型菌株之间的 16S rRNA 基因序列相似性虽然高于 97%, 但它们的表型特征与各自相关的典型菌株间却存在较大差异, 可以初步认为它们分别代表 *Yaniella*, *Bacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Sphingomonas*, *Rheinheimera* 和 *Microbulbifer* 属的 6 个潜在新种 (potential novel species)。基于这些菌株和与它们系统发育关系密切密切的典型菌株的 16S rRNA 基因序列构建的系统进化树见图 1。要最终确定这些菌株的分类地位, 还需要综合形态特征、生理生化特征、细胞化学特征、以及它们与相关典型菌株间的 DNA-DNA 同源性分析等多相分类 (polyphasic taxonomy) 研究结果 (这些研究工作正在进行中)。以上结果揭示了湖南小溪国家级自然保护区非盐环境中存在较丰富的嗜盐及耐盐细菌多样性, 并蕴藏着较多的新类群 (物种)。

### 3 讨论

Echigo 等<sup>[10]</sup>在日本东京周边地区的普通非盐环境 (果园、草坪、牧场和林地等) 土壤中分离到 176 株能耐受 20% (w/v) NaCl 的喜盐细菌 [该文自定义喜盐细菌为能在添加 20% (w/v) NaCl 的培养基上形成菌落的原核生物], 其中大部分 (116 株; 65.9%) 为中度嗜盐菌, 其它为耐盐菌。Echigo 等<sup>[10]</sup>分离的菌株类群多样性较低, 都属于芽孢杆菌科 (Bacillaceae), 其中 161 株菌株属于该科的 7 个已知属 (*Bacillus*, *Filobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Lentibacillus*, *Paraliobacillus*, *Virgibacillus*), 其中 *Halobacillus* 属 (102 株; 63.4%) 为优势属; 另外 15 株与其相近的典型菌株的序列相似性小于 92%, 可能代表了该科的新类群。而本研究的 61 个代表性菌株归属于细菌域的 3 个门 (Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria)、16 个科、18 个属, 类群多样性较高。尽管我们的分离菌株中革兰氏阳性产芽孢菌也略占优势 (34 株, 其中 Bacillaceae 科 33 株, Planococcaceae 科 1 株; 55.7%) (表 2), 但我们的研究结果还表明分离自非盐环境土壤中的嗜盐及耐盐细菌有很大比例的非芽孢菌 (27 株; 44.3%), 其中包括 23 株放线菌门

(Actinobacteria) 和变形菌门 (Proteobacteria) 菌株 (表 2)。我们分离的 8 株中度嗜盐菌也具有较高的类群多样性, 分属于产芽孢革兰氏阳性菌的 3 个属 (*Bacillus*, *Halobacillus*, *Jeotgalibacillus*)、不产芽孢的革兰氏阳性菌 *Yaniella* 属和革兰氏阴性菌 *Microbulbifer* 属。这些结果揭示了湖南小溪国家级自然保护区非盐环境土壤中可培养嗜盐及耐盐菌较丰富的多样性。不同地域非盐环境土壤样品中耐盐和嗜盐菌的分布为什么会呈现如此大的差异? 其它地区非盐环境中耐盐和嗜盐菌多样性如何? 这些问题值得进一步探究。

此外, Echigo 等<sup>[10]</sup>根据其分离自日本普通非盐环境中的耐盐及嗜盐菌均产生抗逆性芽孢的特点, 推测该类微生物的可能来源为, 其芽孢随沙尘暴从中国内蒙古的高盐环境传递到了日本非盐环境土壤中并存活下来。而我们除分离到产芽孢细菌外, 还发现了较多的不产芽孢的革兰氏阳性和革兰氏阴性嗜盐菌和耐盐菌。那么, 这些菌株从何而来? 是如何适用普通非盐环境的? 其分布规律如何? 这些问题值得深入研究。本文的研究结果也提示 Echigo 等<sup>[10]</sup>关于其分离自日本普通非盐环境土壤的嗜盐和耐盐菌来源于中国内陆沙尘暴传播的推测值得商榷。

### 参考文献

- [1] 陈义光, 李汇明, 李沁元, 陈维, 崔晓龙, 杨亚玲, 彭谦, 文孟良, 徐丽华, 邓岚, 王治刚, 刘继辉, 任祺, 肖炜, 刘宏伟. 一平浪盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌的系统发育多样性研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47(4): 571-577.
- [2] 肖炜, 杨亚玲, 刘宏伟, 文孟良, 崔晓龙, 段东成, 陈维, 彭谦, 陈义光, 邓岚, 李沁元, 王治刚, 任祺, 徐丽华. 昆明盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌多样性研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(6): 967-972.
- [3] Chen YG, Cui XL, Zhang YQ, Li WJ, Wang YX, Kim CJ, Lim JM, Xu LH, Jiang CL. *Salinimicrobium terrae* sp. nov., isolated from saline soil, and emended description of the genus *Salinimicrobium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(11): 2501-2504.
- [4] Chen YG, Liu ZX, Peng DJ, Zhang YQ, Wang YX, Tang SK, Li WJ, Cui XL, Liu YQ. *Virgibacillus litoralis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated

- from saline soil. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2009, 96(3): 323-329.
- [ 5 ] Yoon JH, Kang KH, Park YH. *Lentibacillus salicampi* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(6): 2043-2048.
- [ 6 ] Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 2001, 5(2): 73-83.
- [ 7 ] Asad S, Amoozegar MA, Pourbabae AA, Sarbolouki MN, Dastgheib SM. Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource technology*, 2007, 98(11): 2082-2088.
- [ 8 ] 赵百锁, 杨礼富, 宋蕾, 王慧. 中度嗜盐菌在生物技术中的应用. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2007, 34(2): 359-362.
- [ 9 ] 任培根, 周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2003, 43(3): 427-431.
- [ 10 ] Echigo A, Hino M, Fukushima T, Mizuki T, Kamekura M, Usami R. Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm). *Saline Systems*, 2005, 1: 8.
- [ 11 ] Echigo A, Fukushima T, Mizuki T, Kamekura M, Usami R. *Halalkalibacillus halophilus* gen. nov., sp. nov., a novel moderately halophilic and alkaliphilic bacterium isolated from a non-saline soil sample in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(5): 1081-1085.
- [ 12 ] Echigo A, Minegishi H, Mizuki T, Kamekura M, Usami R. *Geomicrobium halophilum* gen. nov., sp. nov., moderately halophilic and alkaliphilic bacteria isolated from soil samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(4): 990-995.
- [ 13 ] Usami R, Echigo A, Fukushima T, Kamekura M, Usami R. *Alkalibacillus silvisoli* sp. nov., an alkaliphilic moderate halophile isolated from non-saline forest soil in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(4): 770-774.
- [ 14 ] 黄苛, 张丽, 刘祝祥, 陈奇辉, 彭清忠, 李文均, 崔晓龙, 陈义光. 硃洲岛海胆可培养细菌的多样性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(11): 1424-1429.
- [ 15 ] Atlas RM, Parks LC. Handbook of microbiological media. Boca Raton FL: CRC Press, 2004: 666-672.
- [ 16 ] Daionov DA, Savoyant L, Dupuy C. Application of the ICP-MS technique to trace element analysis of peridotites and their minerals. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 2007, 16(2): 311-315.
- [ 17 ] Cui XL, Mao PH, Zeng M, Li WJ, Zhang LP, Xu LH, Jiang CL. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiopsaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51(2): 357-363.
- [ 18 ] 肖怀东, 陈义光, 刘祝祥, 黄苛, 李文均, 崔晓龙, 张丽, 易浪波. 湛江硃洲岛海葵相关可培养细菌系统发育多样性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(2): 246-250.
- [ 19 ] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1994, 44(4): 846-849.
- [ 20 ] 刘敏, 李璐滨, 杨凯, 韩继刚, 朱宝成, 彭镇华. 冷箭竹根际土壤中可培养细菌的多样性. *生物多样性 (Biodiversity Science)*, 2008, 16(1): 91-95.
- [ 21 ] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398.
- [ 22 ] Kushner DJ. The Halobacteriaceae//Sokatch JR, Ornston LN. ed. The Bacteria, a Treatise on Structure and Function, vol VIII. San Diego: Academic Press, 1985: 171-206.

# Diversity of halophilic and halotolerant bacteria isolated from non-saline soil collected from Xiaoxi National Natural Reserve, Hunan Province

Qihui Chen<sup>1</sup>, Zhuxiang Liu<sup>1</sup>, Qingzhong Peng<sup>1</sup>, Ke Huang<sup>1</sup>, Jianwu He<sup>1</sup>, Li Zhang<sup>1</sup>, Wenjun Li<sup>2</sup>, Yiguang Chen<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Biology and Environment Sciences, Jishou University, Jishou 416000, China)

(<sup>2</sup> Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To investigate the diversity of cultivable halophilic and halotolerant bacteria isolated from ordinary non-saline soil samples collected from Xiaoxi National Natural Reserve (28°42'15'' – 28°53'15'' N, 110°6'50'' – 110°21'35'' E), Hunan Province, China. [ **Methods** ] Bacterial strains were isolated from the samples by using the conventional culture-dependent method and investigated by using phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence comparisons. [ **Results** ] We isolated 114 bacterial strains (8 moderately halophilic, 19 slightly halophilic, 87 halotolerant) from the samples on media (marine agar 2216, International *Streptomyces* Project medium 2 and 5, nutrient and humic acid agars) supplemented with 5% to 20% (w/v) NaCl. On the basis of morphological, physiological and biochemical characteristics, we selected 61 strains to perform a phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. Results showed that 61 isolates represented 41 species, belonging to 18 genera (*Actinomadura*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Erwinia*, *Halobacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Microbacterium*, *Microbulbifer*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Yaniella*) of 16 families (Alteromonadaceae, Bacillaceae, Brevibacteriaceae, Chromatiaceae, Dermabacteraceae, Enterobacteriaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Nocardiaceae, Planococcaceae, Pseudomonadaceae, Sphingomonadaceae, Staphylococcaceae, Streptomycetaceae, Thermomonosporaceae, Yaniellaceae) in three phyla (Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria). The most abundant and diverse isolates were within the phylum Firmicutes (38 strains; 62.3%) and the phylum Actinobacteria (18 strains; 29.5%). The phylogenetic distance matrix results suggested that there were obvious genetic divergences between most isolates and their closely related type strains (16S rRNA gene sequence similarities ranged from 96.9% to 99.8%), and that, out of 61 isolates, at least 7 strains (JSM 070026, JSM 081004, JSM 081006, JSM 081008, JSM 083058, JSM 083085, JSM 084035) should represent 7 potential novel species within 6 characterized genera (*Yaniella*, *Bacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Sphingomonas*, *Rheinheimera*, *Microbulbifer*). [ **Conclusion** ] The results presented here showed that there is abundant diversity of halophilic and halotolerant bacteria, as well as a number of novel species in non-saline soil collected from Xiaoxi National Natural Reserve, Hunan Province, China.

**Keywords:** ordinary non-saline soil; halophilic and halotolerant bacteria; culture-dependent method; 16S rRNA gene sequence; phylogenetic analysis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970007), by the Key Projects of International Cooperation (2007DFB31620) and by the Project from Jishou University (09JDY022).

\* Corresponding author. Tel: +86-743-8564416; Fax: +86-743-8565323; E-mail: mchenjsu@yahoo.com.cn

Received: 10 April 2010/Revised: 10 May 2010