

松嫩平原盐碱地中耐(嗜)盐菌的生物多样性

潘媛媛, 黄海鹏, 孟婧, 肖鸿禹, 李成, 孟琳, 洪闪, 刘贺男, 王雪枫, 姜巨全*

东北农业大学生命科学学院微生物与生物化工系, 大豆生物学教育部重点实验室, 哈尔滨 150030

摘要: 【目的】分离纯化松嫩平原盐碱地中可培养的耐盐菌和嗜盐菌, 并分析其生物多样性。【方法】采用纯培养法和定向富集法从该地区盐碱土样中分离耐盐菌和嗜盐菌, 然后通过 16S rRNA 基因同源性比对鉴定所分离细菌的系统发育学地位, 从而获取松嫩平原盐碱地中耐盐菌和嗜盐菌的多样性信息。【结果】共分离到细菌 40 株, 分属于细菌域中 3 个门 (Actinobacteria, Firmicutes, γ -Proteobacteria)、8 个科、16 个属、34 个种。其中多数菌株属于厚壁菌门 (Firmicutes), 最优势属为葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) (8 株, 占总菌株的 20%), 其次依次为盐单胞菌属 (*Halomonas*) (5 株, 12.5%)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*) (4 株, 10%)、大洋芽胞杆菌属 (*Oceanobacillus*) (4 株, 10%)、库克菌属 (*Kocuria*) (4 株, 10%) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (3 株, 7.5%) 等。其中 9 株细菌的 16S rRNA 基因序列与最近缘种的同源性在 97.2% - 99.0% 之间, 可能为新种。菌株耐盐能力主要在 5% - 10% 之间, 其中 62.5% 的菌株为耐盐菌, 其余则为中度嗜盐菌。所有菌株的耐碱能力在 pH 9 - 12 之间, 其中 60% 的菌株耐碱能力则高达 pH 12, 除两株为嗜碱菌, 其余均为耐碱菌。【结论】研究结果表明, 松嫩平原盐碱地中耐盐菌与嗜盐菌种群丰富, 主要以葡萄球菌和盐单胞菌为主, 菌株不仅耐盐能力高而且耐碱能力也高, 并且该地区可能含有丰富的耐盐菌和嗜盐菌的新物种。

关键词: 耐盐菌, 嗜盐菌, 16S rRNA 基因序列, 生物多样性, 松嫩平原盐碱地

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 10-1187-08

在细菌生长的环境中可能存在盐、温度、水分等各种胁迫因素。其中, 盐被认为是最具危害性的非生物类胁迫因素之一^[1]。根据对盐的依赖程度, 细菌可分为耐盐菌和嗜盐菌两大类。耐盐菌指耐受一定浓度的盐, 但生长不依赖于盐的微生物, 如金黄色葡萄球菌。嗜盐菌专指那些依赖一定浓度的盐而生长的微生物。根据嗜盐浓度不同, 可分为轻度嗜盐菌 (1.2% - 2.9%), 中度嗜盐菌 (2.9% - 11.7%) 和极端嗜盐菌 (> 17.6%)^[2]。高盐对细菌的生

长、存活和生理功能都有非常大的影响。因此, 对耐(嗜)盐菌的研究一直以来都是人们关注的课题之一, 目前主要集中在对其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^[3-6]。近年来, 国内外学者使用 16S rRNA 基因同源性, 开展了包括海洋、晒盐场、盐湖、盐滩、盐渍土壤以及地下岩盐和盐卤等不同盐环境中耐盐菌和嗜盐菌的多样性分析, 并发现了多个耐盐菌和嗜盐菌类群^[7-13]。

松嫩平原盐碱地是世界三大著名的 Na_2CO_3 类

基金项目: 国家自然科学基金 (31000055); 中国博士后基金特别基金资助项目 (201104408); 黑龙江省教育厅海外学人重点项目 (1251HZ001); 东北农业大学博士启动基金 (2009RC23); 大豆生物学教育部重点实验室开放基金项目 (SB11A05)

* 通信作者。Tel: +86-451-55191132; Fax: +86-451-55190413; E-mail: jjqdainty@yahoo.com.cn

作者简介: 潘媛媛 (1987-), 女, 吉林通化人, 硕士, 主要从事分子微生物学方面的研究。E-mail: xinyuanfuture@136.com

收稿日期: 2012-03-21; **修回日期:** 2012-06-27

型盐碱地之一,是我国碱积盐成土(碱土)面积最大的地区^[14]。该地区的土壤类型以 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 为主,含有少量硫酸盐和氯化物^[15],土壤的 pH 值普遍在 8.5 - 11 之间^[16],土壤不仅盐浓度高而且碱度大。这样独特的地理环境必然使其所生长的耐盐菌和嗜盐菌表现出一定的种群差异性,而且极可能蕴藏着丰富的新种资源。目前在该地区已经分离到了多个耐盐菌或嗜盐菌的新种,如:大庆盐单胞菌 (*Halomonas daqingensis*)、大庆盐陆生菌 (*Haloterrigena daqingensis*) 和大庆嗜烃菌 (*Hydrocarboniphaga daqingensis*) 等等^[17-19]。因此,本研究采用纯培养法对松嫩平原区域盐碱土壤样品中可培养耐盐菌及嗜盐菌进行分离,并使用基于 16S rRNA 基因序列的系统发育学分析方法对其多样性进行了分析。研究结果表明,该地区耐盐菌和嗜盐菌的种群多样性是非常丰富的,而且蕴藏着大量的耐盐菌和嗜盐菌的新种,这为该地区耐盐菌和嗜盐菌的深入研究以及开发利用提供了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 仪为东胜·龙;凝胶成像分析仪购自 Bio-Rad 公司;恒温振荡培养箱购自上海一恒科技有限公司(HZQ-F160);*Taq* DNA 聚合酶购自天根生化科技有限公司;引物由北京华大基因研究院合成。

1.1.2 培养基:按文献 [20] 所述的 Sehgal-Gibbons 培养基配方配制,如无特殊说明,pH 值调至 7.2 - 7.4。在制备固体平板时加入琼脂 15 g。在测试细菌耐盐性时,NaCl 视需要量添加。在测试细菌耐碱性时,pH 值使用 KOH 调至所需值。

1.2 土样采集与处理

2010 年 10 月,从松嫩平原盐碱地的肇东、杜蒙、大庆和安达等盐碱度最重的地区共采集 5 cm - 20 cm 的表层土样 19 份,装入无菌的聚氯乙烯塑料袋,带回实验室,并马上进行菌株富集与分离。

1.3 菌株富集与分离

将土样混合均匀,各称取 5g 置于 250 mL 含 5% (w/v) NaCl 的 Sehgal-Gibbons 液体培养基中,在 28℃ 以 160 r/min 振荡培养。2 - 3d 后,将富集的菌

悬液在 0.9% (w/v) 无菌生理盐水中逐级稀释至 10^{-4} 、 10^{-6} 和 10^{-8} ,然后取各稀释度的菌悬液 0.1 mL 分别涂布于含 5%、10%、15% 和 20% (w/v) NaCl 的 Sehgal-Gibbons 培养基系列平板上,在 28℃ 静置培养。5 - 7d 后,挑取单菌落。根据菌落形态、颜色以及菌体显微形态等表型特征鉴定菌落是否为纯培养。如果是,将其制成 15% 的甘油保藏液, -80℃ 冻藏保存;如果不是,则将其采用上述方法重新纯化直至获得纯培养后保藏。

1.4 菌株耐盐碱性测试

测试细菌耐盐性时,所有纯培养分别接种于含有 0%、5%、10%、15% 和 20% (w/v) NaCl 的 Sehgal-Gibbons 培养基平板上,在 28℃ 静置培养 2d 后观察生长情况。测试细菌耐碱性时,所有纯培养分别接种于 pH 值被调至 6.5 - 13 的 Sehgal-Gibbons 培养基平板上,在 28℃ 静置培养 2d 后观察生长情况。

1.5 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

采用菌液 PCR 法扩增细菌 16S rRNA 基因序列。扩增引物采用细菌 16S rRNA 的通用引物 Eubac27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',大肠杆菌 16S rRNA 的 8 - 27 bp 处) 和原核微生物特异性引物 Eubac1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3',大肠杆菌 16S rRNA 的 1491 - 1509 bp 处)。反应体系 (50 μL): 10 \times PCR buffer 5 μL , 5 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 2.5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 4 μL , 2.5 U/ μL *Taq* 聚合酶 1 μL , 超纯水 34.5 μL , 过夜培养菌液 0.5 μL 。反应步骤: 95℃ 10 min; 94℃ 1 min, 52 - 58℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。测序引物与扩增引物相同,测序长度为 1500 bp 左右。所得序列提交 GenBank 数据库,获取序列号 (Accession number)。采用 Blast search 在线分析及 DNAMAN 6.0 软件进行序列比对,找出各序列在 NCBI 数据库中最近缘种的模式菌株序列,用 MEGA 5.0 中的 Clustal X 程序进行多序列比对,然后用 Neighbor-Joining 方法选择 Bootstrap 为 1000 个重复构建系统发育学进化树。

2 结果

2.1 菌株的分离与筛选

在 Sehgal-Gibbons 培养基中添加 5% (w/v) NaCl 时出菌率最高,菌落形态、颜色等表型特征的

多样性最高;在添加 10% (w/v) 和 15% (w/v) NaCl 时次之;超过 15% (w/v) NaCl 时出菌率显著下降;而在添加 20% (w/v) NaCl 时只有少量微小菌落出现。最终从本次采集的土样中分离到 129 株纯培养物。根据菌落形态、颜色、菌体显微形态等表型特征以及 NaCl 的耐受情况,去掉部分冗余菌株,最终从 129 个分离物中确定了 81 个表型特征不同的菌株用于后续的 16S rRNA 基因序列分析。

2.2 菌株 16S rRNA 基因序列的同源性比较

通过 DNAMAN 6.0 软件对菌株 16S rRNA 基因序列的同源性进行比对,对 81 个菌株进行 16S rRNA 基因序列分析并最终确定 40 个代表菌株进行后续分析。菌株的 16S rRNA 基因序列的序列号为 JQ76226-JQ762305。同源性比对结果表明,除了 8 个菌株 (NEAU-ST15-18、NEAU-ST10-10、NEAU-ST10-30、NEAU-ST10-45、NEAU-ST10-47、NEAU-ST15-15、NEAU-ST15-27、NEAU-ST20-1) 与最近缘种的模式菌株的 16S rRNA 基因序列同源性为 100% 外,其余菌株与最近缘种的模式菌株的 16S rRNA 基因序列同源性在 97.2% - 99.9% 之间,说明大部分菌株与其最近缘种之间存在一定的遗传差异。

2.3 菌株的耐盐碱性

如表 1 所示,在以上 40 个代表菌株中,16 株能耐受 5% (w/v) NaCl,18 株能耐受 10% (w/v) NaCl,5 株能耐受 15% (w/v) NaCl,1 株能耐受 20% (w/v) NaCl,可见菌株的耐盐能力主要在 5% - 10% 之间。其中 15 株表现出对 3% - 8% (w/v) NaCl 的生长依赖性,属于中度嗜盐菌;而其余菌株则能耐受不同浓度的 NaCl 但并不依赖其生长,属于耐盐菌。如表 1 所示,耐盐菌分属于葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、库克菌属 (*Kocuria*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等 10 个属,以葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 为最优势属;中度嗜盐菌分属于盐单胞菌属 (*Halomonas*)、大洋芽胞杆菌属 (*Oceanobacillus*)、动性球菌 (*Planococcus*)、咸海鲜球菌属 (*Jeotgalicoccus*)、刘志恒菌属 (*Zhihengliuella*) 和盐水球菌属 (*Salinicoccus*) 6 个属,以盐单胞菌属 (*Halomonas*) 为最优势属。所有菌株的耐碱能力在 pH 9 - 12 之间,其中 3 株能耐受 pH 9,13 株能耐受 pH 10,24 株则能耐受高达 pH 12。除属于盐单胞菌属 (*Halomonas*) 的两个菌株对大于 9 的 pH 表现出依赖性,属于嗜碱菌,其余菌株则均属于耐碱菌。

2.4 基于 16SrRNA 基因序列的系统发育学分析

基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析结果表明,40 个代表菌株分属于细菌域的 3 个门 (Actinobacteria, Firmicutes, γ -Proteobacteria)、8 个科 (Bogoriellaceae, Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Halomonadaceae, Micrococcaceae, Planococcaceae, Pseudomonadaceae, Staphylococcaceae) (图 1)、16 个属 (*Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Exiguobacterium*, *Georgenia*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Jeotgalicoccus*, *Micrococcus*, *Oceanobacillus*, *Planomicrobium*, *Planococcus*, *Pseudomonas*, *Salinicoccus*, *Zhihengliuella*, *Staphylococcus*) (表 1) 中的 34 个种。

如图 1 所示,在松嫩平原盐碱地耐(嗜)盐菌中,厚壁菌门 (Firmicutes) 的菌株所占比例最大 (23/40, 占总菌株的 57.5%),为最优势类群;其次是变形菌门 γ 亚群 (γ -proteobacteria) (10/40, 25.0%) 和放线菌门 (Actinobacteria) (7/40, 17.5%)。在细菌属水平上的种群多样性非常丰富,所有菌株分属于 16 个不同的属。其中最优势属为葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) (8 株,占总菌株的 20%),其次依次为盐单胞菌属 (*Halomonas*) (5 株,12.5%)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*) (4 株,10%)、大洋芽胞杆菌属 (*Oceanobacillus*) (4 株,10%)、库克菌属 (*Kocuria*) (4 株,10%)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (3 株,7.5%)、动性球菌属 (*Planococcus*) (2 株,5%) 和肠杆菌属 (*Enterbacter*) (2 株,5%)。其余菌株各 1 株,分属于微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、乔治菌属 (*Georgenia*)、喜盐芽胞杆菌属 (*Halobacillus*)、咸海鲜球菌属 (*Jeotgalicoccus*)、动性球菌属 (*Planococcus*)、动性微菌属 (*Planomicrobium*)、盐水球菌属 (*Salinicoccus*) 和刘志恒菌属 (*Zhihengliuella*)。

2.5 潜在的新种

在 40 个代表菌株中,9 株与最近缘种的模式菌株的 16S rRNA 基因序列同源性在 97.0% - 99.0% 之间,可能为新种。其中 NEAU-ST5-5 和 NEAU-ST5-21 与假单胞菌属中的模式菌株 (*Pseudomonas chloritidismutans* AW-1^T) 的 16S rRNA 基因序列同源性分别为 99.0% 和 98.9%;NEAU-ST5-12 和 NEAU-ST5-33 与玫瑰色库克菌的模式菌株 (*Kocuria roseus* DSM20447^T) 的 16S rRNA 基因序列同源性分别为 97.2% 和 98.9%;NEAU-ST5-19 与墨西哥微小杆菌

表 1 松嫩平原盐碱地耐(嗜)盐细菌的耐盐碱性状分析

Table 1 NaCl and alkaline pH tolerance of the halotolerant and halophilic bacteria isolated from saline-alkaline soils in Songnen Plain

Genus	Isolate ID	NaCl range (Optimum) %	pH range (Optimum)	Bacterial type
<i>Arthrobacter</i>	NEAU-ST3-1	0-5 (0)	6.5-10 (7-8)	Halotolerant & Alkalitolerant
<i>Bacillus</i>	NEAU-ST5-10	0-5 (0-2)	6.5-9 (6.5-8)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST5-24	0-5 (0-3)	6.5-10 (8)	Halotolerant & Alkalitolerant
<i>Enterobacter</i>	NEAU-ST10-1	0-10 (0-2)	6.5-9 (6.5-8)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST10-47	0-10 (0-2)	7-10 (8)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST5-3	0-5 (0-2)	6.5-10 (6.5)	Halotolerant & Alkalitolerant
<i>Exiguobacterium</i>	NEAU-ST5-32	0-5 (0-1)	6.5-12 (6.5-7)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST5-19	0-5 (0-3)	7-12 (8-9)	Halotolerant & Alkalitolerant
<i>Georgenia</i>	NEAU-ST5-34	0-5 (0-2)	6.5-10 (6.5)	Halotolerant & Alkalitolerant
<i>Halobacillus</i>	NEAU-ST10-40	0-10 (3)	7-10 (8)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
<i>Halomonas</i>	NEAU-ST10-25	0-10 (3)	6.5-12 (11-12)	Moderately halophilic & Alkaliphilic
	NEAU-ST10-30	0-10 (3-5)	6.5-12 (8-9)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
	NEAU-ST10-32	0-10 (3)	6.5-12 (10)	Moderately halophilic & Alkaliphilic
	NEAU-ST10-39	0-10 (4)	6.5-12 (6.5-9)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
<i>Jeotgalicoccus</i>	NEAU-ST15-21	0-15 (3)	6.5-12 (8-9)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
	NEAU-ST10-45	0-10 (3-5)	6.5-12 (7)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
<i>Kocuria</i>	NEAU-ST5-12	0-5 (0-3)	6.5-10 (6.5-7)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST5-23	0-5 (0-3)	6.5-10 (7)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST5-33	0-5 (0)	6.5-10 (6.5-8)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST10-10	0-10 (0)	6.5-10 (6.5-7)	Halotolerant & Alkalitolerant
<i>Oceanbacillus</i>	NEAU-ST5-18	0-5 (3)	7-12 (8)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
	NEAU-ST10-43	0-10 (3)	6.5-12 (8)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
	NEAU-ST10-56	1-10 (3-5)	6.5-12 (7-8)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
	NEAU-ST10-60	1-10 (3-8)	7-12 (8-9)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
<i>Planococcus</i>	NEAU-ST10-9	0-10 (3-5)	6.5-12 (8-9)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
	NEAU-ST10-15	0-10 (3)	6.5-12 (6.5-7)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
<i>Planomicrobium</i>	NEAU-ST5-40	0-5 (0-3)	6.5-10 (7-8)	Halotolerant & Alkalitolerant
<i>Pseudomonas</i>	NEAU-ST5-4	0-5 (0)	6.5-12 (6.5-7)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST5-5	0-5 (0)	6.5-12 (6.5-7)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST5-21	0-5 (0)	6.5-10 (6.5-7)	Halotolerant & Alkalitolerant
<i>Salinicoccus</i>	NEAU-ST10-44	0-10 (3)	6.5-9 (8)	Moderately halophilic & Alkalitolerant
<i>Staphylococcus</i>	NEAU-ST5-8	0-5 (0-2)	6.5-12 (8)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST15-10	0-15 (0-2)	6.5-12 (7)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST15-15	0-15 (0-2)	6.5-12 (6.5-8)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST15-18	0-15 (0-2)	6.5-12 (6.5-8)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST15-24	0-15 (0-5)	6.5-12 (8)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST15-26	0-15 (0-2)	6.5-12 (6.5-7)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST15-27	0-15 (0-3)	6.5-12 (8)	Halotolerant & Alkalitolerant
	NEAU-ST20-1	0-20 (0-2)	6.5-12 (6.5)	Halotolerant & Alkalitolerant
	<i>Zhihengliuella</i>	NEAU-ST15-7	0-15 (3-5)	6.5-10 (6.5-8)

的模式菌株 (*Exiguobacterium mexicanum* 8N^T) 的 16S rRNA 基因序列同源性为 99.0%; NEAU-ST5-34 与乔治菌属中的模式菌株 (*Georgenia soli* CC-NMPT-T3^T) 的 16S rRNA 基因序列同源性为 98.3%; NEAU-ST10-9 与莱比托游动球菌的模式菌株 (*Planococcus rifietoensis* M8^T) 的 16S rRNA 基因序列同源性为 98.9%; NEAU-ST10-39 与盐单胞菌属 (*Halomonas*) 的 3 个种的模式菌株海水盐单胞菌

(*Halomonas aquamarina* DSM30161^T)、轴向海山盐单胞菌 (*Halomonas axialensis* ATCC BAA-802^T) 和南方盐单胞菌 (*Halomonas meridiana* DSM5425^T) 的 16S rRNA 基因序列同源性均为 98.2%; NEAU-ST10-40 与嗜碱喜盐芽胞杆菌的模式菌株 (*Halobacillus alkaphilus* FP5^T) 的 16S rRNA 基因序列同源性为 98.8%。此外,上述菌株的菌落颜色、耐盐范围及其最适值、pH 耐受范围及其最适值以及生长温度范围

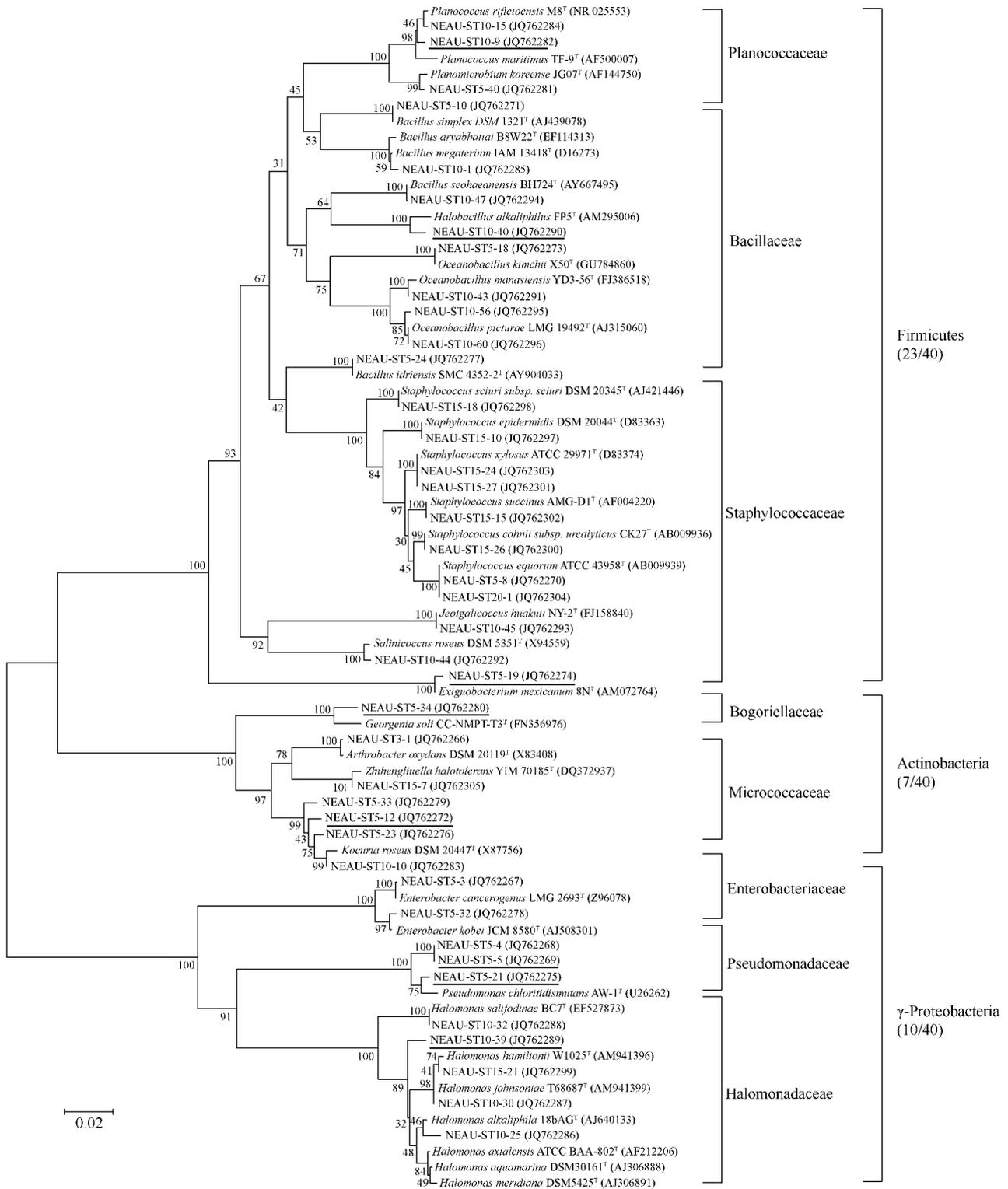


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的松嫩平原盐碱地中耐(嗜)盐细菌群落的系统发育树

Fig. 1 Neighbor-Joining tree constructed based on the 16S rRNA gene sequence similarities of the 40 isolates from saline-alkaline soils in Songnen Plain and their closest related species. Bootstrap values are shown (1000 resamplings) at the branching points. Numbers in parentheses represent the GenBank accession numbers of the sequences. The scale bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position. Underlined isolates represent the potential novel species.

及其最适值等表型特征与其最近缘种的模式菌株均存在一定差异。例如, NEAU-ST5-12 和 NEAU-ST5-33 的菌落颜色为灰白色和浅黄色, 而其最近缘种玫瑰色库克菌的模式菌株 *Kocuria roseus* DSM20447^T 的菌落颜色却为粉色(该菌株因此而得名)。NEAU-ST10-40 的菌落颜色为金黄色, 而其最近缘种嗜碱喜盐芽胞杆菌的模式菌株 *Halobacillus alkaphilus* FP5^T 的菌落颜色则为橙色; 并且二者的耐盐范围和最适值也均不同, 前者耐盐范围为 0 - 10% 而最适值为 3%, 后者耐盐范围则为 5% - 25% 而最适值则为 10%。为最终确定上述菌株的分类地位, 我们正在使用包括生理生化特征、MLST 序列分析、DNA-DNA 杂交以及脂肪酸分析等多相分类方法对其进行鉴定, 以确定它们是否为新种。

3 讨论

本研究采用定向富集法与基于 16S rRNA 的系统发育学分析相结合, 首次对松嫩平原盐碱地中可培养的耐(嗜)盐菌的生物多样性进行了全面的分析。研究表明, 松嫩平原盐碱地可培养的耐(嗜)盐菌种群多样性非常丰富, 40 个代表菌株分属于细菌域中 3 个门 (Actinobacteria, Firmicutes, γ -Proteobacteria)、8 个科、16 个属、34 个种。其中多数菌株属于厚壁菌门 (Firmicutes), 耐盐菌占总菌数的 65%, 以葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 为最优势属, 而中度嗜盐菌占 35%, 以盐单胞菌属 (*Halomonas*) 为最优势属。在所有菌株中, 9 株与最近缘种的模式菌株的 16S rRNA 基因序列的同源性在 97.2% - 99.0% 之间, 而且其表型特征与模式菌株也存在一定差异, 可能为新种, 占总菌数的 22.5%, 暗示松嫩平原盐碱地可能含有丰富的耐盐菌和嗜盐菌的新物种。菌株耐盐能力主要在 5% - 10%, 而耐碱能力在 pH 9 - 12 之间。松嫩平原盐碱地土壤类型以 Na_2CO_3 和 NaHCO_3 为主^[15], 土壤的 pH 值普遍在 8.5 - 11 之间^[16]。因此, 该地区土壤的高盐碱度很可能是导致其耐(嗜)盐菌普遍具有高耐盐碱能力的主要原因。

国内学者采用定向富集法与基于 16S rRNA 的系统发育学分析相结合对江苏连云港台北盐田和盐城三圩盐田^[9]、新疆达坂盐湖^[10]、云南省一平浪盐矿古老岩盐^[10]、四川自贡大公古盐井盐卤^[12] 以及

昆明盐矿古老岩盐^[13] 等盐环境中的嗜盐菌进行了多样性研究。将本研究获得的松嫩平原盐碱地的耐(嗜)盐菌的菌群结构与上述地区进行比较, 发现本研究所获得的盐单胞菌属 (*Halomonas*)、喜盐芽胞杆菌属 (*Halobacillus*) 和芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 在上述地区中均有分布。其中江苏连云港台北盐田和盐城三圩盐田以盐单胞菌属 (*Halomonas*) 为最优势属^[9]; 新疆达坂盐湖以芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 为最优势属, 其次为喜盐芽胞杆菌属 (*Halobacillus*) 和盐单胞菌属 (*Halomonas*)^[10]; 云南省一平浪盐矿古老岩盐以芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 和盐水球菌属 (*Salinicoccus*) 为最优势属, 其次是海杆状菌属 (*Marinobacter*) 和盐单胞菌属 (*Halomonas*)^[11]; 四川自贡大公古盐井盐卤以喜盐芽胞杆菌属 (*Halobacillus*) 为最优势属^[12]; 昆明盐矿古老岩盐以芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 为最优势属; 其次是盐单胞菌属 (*Halomonas*)^[13]。本研究发现松嫩盐碱地中度嗜盐菌以盐单胞菌属 (*Halomonas*) 为最优势属, 其次为大洋芽胞杆菌属 (*Oceanobacillus*)。通过比较分析, 可见尽管上述盐环境地域不同, 但多以盐单胞菌属 (*Halomonas*)、喜盐芽胞杆菌属 (*Halobacillus*) 或芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 为最优势属, 说明这 3 个属在不同的盐环境中适应能力较强。此外, 松嫩平原盐碱地的中度嗜盐菌中大洋芽胞杆菌属 (*Oceanobacillus*) 较多, 该属在昆明盐矿古老岩盐^[12] 中尽管也有发现但数量并不多, 因此, 大洋芽胞杆菌属 (*Oceanobacillus*) 是松嫩平原盐碱地中度嗜盐菌的独特种属。与上述地区显著不同的是, 松嫩平原盐碱地多以耐盐菌为主, 且最优势属为葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)。我们发现葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 的细菌存在于被采集的所有土样中, 这也侧面说明该属细菌普遍存在于松嫩平原盐碱地中。本研究还发现库克菌属 (*Kocuria*) 在耐盐菌中也占较大比例, 该属仅在昆明盐矿古老岩盐中发现一株^[13]。此外, 松嫩平原盐碱地还存在一些独特的耐(嗜)盐菌类群, 如微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、乔治菌属 (*Georgenia*)、刘志恒菌属 (*Zhihengliuella*)、动性球菌属 (*Planococcus*)、咸海鲜球菌属 (*Jeotgalicoccus*)、盐水球菌属 (*Salinicoccus*) 等, 其中盐水球菌属 (*Salinicoccus*) 为云南省一平浪盐矿古老岩盐的优势属^[11], 动性球菌属 (*Planococcus*) 在四川自贡大公古盐井盐卤中被发现^[12], 咸海鲜球菌属

(*Jeotgalicoccus*) 在昆明盐矿古老岩盐中被发现^[13]。然而, 微小杆菌属 (*Exiguobacterium*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、乔治菌属 (*Georgenia*) 和刘志恒菌属 (*Zhihenliuella*) 在上述地区均未发现, 说明松嫩平原盐碱地的耐盐菌和嗜盐菌的种群生物多样性是非常丰富的。

参考文献

- [1] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62 (2): 504-544.
- [2] Kushner DJ. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria // *Microbial Life in Extreme Environments*. ed. London: Academic Press, Ltd., 1978: 317-368.
- [3] Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 2001, 5 (2): 73-83.
- [4] Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002, 28 (1): 56-63.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Hedi A, Sadfi N, Fardeau M, Rebib H, Cayol J, Ollivier B, Boudabous A. Studies on the Biodiversity of Halophilic Microorganisms Isolated from El-Djerid Salt Lake (Tunisia) under Aerobic Conditions. *International Journal of Microbiology*, 2009, Article ID 731786, 17 pages.
- [8] Ghozlan H, Deif H, Kandil RA, Sabry S. Biodiversity of moderately halophilic bacteria in hypersaline habitats in Egypt. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2006, 52 (2): 63-72.
- [9] 何敏艳, 邹正中, 蔡林, 王革娇. 连云港台北和盐城三圩盐田土壤嗜盐菌多样性研究. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2008, 35 (5): 737-742.
- [10] 吴海平, 王真辉, 杨礼富. 新疆达坂盐湖沉积土壤的嗜盐细菌定向富集和多样性分析. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2010, 37 (7): 956-961.
- [11] 陈义光, 李汇明, 李沁元, 陈维, 崔晓龙. 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.
- [12] 冯玮, 向文良, 郭建华, 宋鹏, 张驰, 杨志荣. 四川大公古盐井中可培养中度嗜盐菌的初步分析. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2008, 35 (11): 1691-1697.
- [13] 肖炜, 杨亚玲, 刘宏伟, 文孟良, 崔晓龙. 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.
- [14] 李秀军, 李取生, 王志春, 刘兴土. 松嫩平原西部盐碱地特点及合理利用研究. *农业现代化研究 (Research of Agricultural Modernization)*, 2002, 32 (5): 361-364.
- [15] 冯玉杰, 张巍, 陈桥, 马程慧. 松嫩平原盐碱化草原土壤理化特性及微生物结构分析. *土壤 (Soils)*, 2007, 39 (2): 301-305.
- [16] 司振江, 张忠学, 李芳花, 黄彦. 松嫩平原盐碱土集成分治理技术的研究. *灌溉排水学报 (Journal of Irrigation and Drainage)*, 2010, 29 (3): 80-84.
- [17] Wu G, Wu Xi, Wang Y, Wang Y, Chi C, Tang Y, Kida K, Wu X, Luan Z. *Halomonas daqingensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from an oilfield soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58 (12): 2859-2865.
- [18] Wang S, Yang Q, Liu Z, Sun L, Wei D, Zhang J, Song J, Yuan H. *Haloterrigena daqingensis* sp. nov., an extremely haloalkaliphilic archaeon isolated from salt-alkaline soils in Daqing, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60 (10): 2267-2271.
- [19] Liu Y, Song X, Jiang J, Liu Y, Xu C, Liu H, Liu Z. *Hydrocarboniphaga daqingensis* sp. nov., isolated from freshwater of Longhu Lake in Daqing, northeast of China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61 (2): 408-411.
- [20] Sehgal SN, Gibbons NE. Effect of some metal ions on the growth of halobacterium cutirubrum. *Canadian Journal of Microbiology*, 1960, 6 (2): 165-169.

Biodiversity of culturable halotolerant and halophilic bacteria isolated from saline-alkaline soils in Songnen Plain

Yuanyuan Pan, Haipeng Huang, Jing Meng, Hongyu Xiao, Cheng Li, Lin Meng, Shan Hong, Henan Liu, Xuefeng Wang, Juquan Jiang*

Key Laboratory of Soybean Biology of Ministry of Education; Microbiology and Biotechnology, College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: [Objective] To analyze the biodiversity of halotolerant and halophilic bacteria the bacteria in saline-alkaline soils in Songnen Plain, we isolated and purified bacteria samples in the area., [Methods] Halotolerant and halophilic bacteria were isolated from the enriched cultures of the saline-alkaline soil samples through the traditional culture method, and 16S rRNA sequences were amplified and analyzed for the determination of phylogenetic relationships. [Results] Forty strains were obtained and classified into 34 species, 16 genera, 8 families, 3 phylum (Firmicutes, γ -Proteobacteria and Actinobacteria) in the Domain Bacteria. The genus *Staphylococcus* is the predominant group, followed by *Halomonas*, *Oceanobacillus*, *Bacillus*, *Kocuria* and *Pseudomonas*. The 16S rRNA sequences of 9 strains showed 97.2 to 99.0% similarities with their closest type strains, suggesting that they may be the potential novel species. The salt tolerance of the strains is mainly concentrated on the 5% – 10% NaCl while alkaline pH resistance of the strains is between pH 9 and 12. Based on the NaCl dependence, 62.5% of the strains were grouped into the halotolerant bacteria, and the rest into the moderate halophiles. [Conclusion] The halotolerant and halophilic bacteria are very rich in the saline-alkaline soils in Songnen Plain, and the genera *Staphylococcus* and *Halomonas* are the predominant groups. Almost all the bacteria from this area could tolerate not only at the high concentration of NaCl, but also at high alkaline pH. More importantly, a number of novel species may be included in this area.

Keywords: halotolerant bacteria, halophilic bacteria, 16S rRNA sequence, biodiversity, saline-alkaline soils in Songnen Plain

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31000055), by the Special Financial Grant from China Postdoctoral Science Foundation (201104408), by the Key Project of Returned Overseas Chinese Scholars of Heilongjiang Province of China (1251HZ001), by the Doctor Start-up Fund of Northeast Agricultural University (2009RC23) and by the Key Laboratory Open Fund of Soybean Biology of Ministry of Education (SB11A05)

* Corresponding author. Tel: +86-451-55191132; Fax: +86-451-55190413; E-mail: jjqdainty@yahoo.com.cn

Received: 21 March 2012 / Revised: 27 June 2012