

# 昆明盐矿古老岩盐沉积中的原核生物多样性

肖 炜<sup>1</sup> 彭 谦<sup>1</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> 昆明理工大学 生物与化学工程学院 昆明 650224)

(<sup>3</sup> 云南大学 生命科学教学实验中心 昆明 650091) (<sup>4</sup> 云南盐化股份有限公司 昆明 650011)

**摘 要** 应用 PCR-DGGE 和 rRNA 分析法研究了昆明盐矿古老岩盐沉积中的原核生物多样性。样品的细菌 DGGE 分析得到 27 条带,古菌得到 18 条带。样品与纯培养得到的 19 个属菌株的 DGGE 图谱对比分析发现,细菌 18 个属菌株,只有 1 个属菌株与样品中的 1 条带迁移位置都不一致,古菌 1 个属的菌株不与样品中任何条带迁移位置一致。表明纯培养所得菌株并非该环境中的优势类群。同时,建立了样品细菌和古菌的 16S rDNA 克隆文库,从中分别挑取 36 个细菌克隆和 20 个古菌克隆进行 ARDRA 分析。细菌可分为 10 个 OTUs,其中 3 个 OTUs 是优势类群,分别占 38.9% 25.0% 16.7%,其余 7 个 OTUs 各含有 1 个克隆。古菌分为 8 个 OTUs,没有明显的优势类群。每个 OTU 的代表克隆 16S rDNA 序列分析表明,细菌分属 3 大类群:  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria 和 Actinobacteria,以 *Pseudomonas* 属菌为优势,含有其它岩盐沉积中没有发现的 Actinobacteria。古菌主要是 *Halorubrum* 属、*Haloterrigena* 属菌和未培养古菌。本研究表明,昆明盐矿古老岩盐沉积具有较丰富的原核生物多样性,含有大量未知的、未培养或不可培养的原核生物,但在原核生物物种组成和丰度上,免培养与此前的纯培养研究结果存在一定差异。因此,结合使用两类方法才能较全面地认识高盐极端环境微生物的多样性。

**关键词**: 古老岩盐沉积; 16S rDNA; PCR-DGGE; 克隆文库; ARDRA; 原核生物多样性

**中图分类号**: Q939 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2007)02-0295-06

高盐环境作为研究微生物多样性的模式系统正受到越来越多研究者的关注。大量盐湖、盐碱土、晒盐池和海底沉积物得到全面而深入的研究。但自从 1913 年 Namyslowski 首先认识到盐矿微生物以来<sup>[1]</sup>,只有少量研究描述盐矿中微生物的多样性<sup>[1-7]</sup>。盐矿古老岩盐沉积作为地球上高盐环境的重要组成部分,并具备其它高盐环境所没有的环境特征,同样具有重要的研究价值。对盐矿古老岩盐沉积的研究有助于人们认识盐矿中生物的物种组成、起源、适应与进化,以及它们在能量流动和物质循环过程中的作用。并为生产应用提供丰富的资源,如细菌视紫红质、相容性溶质、胞外多糖、表面活性剂、耐盐酶、PHB 等<sup>[8]</sup>。

目前,纯培养方法只能获得环境中微生物总量的约 1% ~ 5%<sup>[9]</sup>,这使人们对微生物群落结构及其影响因素知之甚少。因此,为了更深入地了解微生物多样性和它们在生态系统中的作用,采用新方法已成为必须。近 20 年来,分子生物学技术被不断引

入微生物生态学的研究,这些技术不需要获得微生物的纯培养物便可更为客观地了解环境微生物的多样性,这类方法被统称为免培养方法(cultivation-independent method)。免培养方法的使用极大地推动着现代微生物生态学的发展,使人们能从基因水平上了解微生物多样性,并证实环境中的微生物多样性比预想的更加丰富。

昆明盐矿古老岩盐沉积属上侏罗统含盐地层,盐层距地表面 300 ~ 760 m。纯培养研究表明昆明盐矿古老岩盐沉积中具丰富的细菌多样性<sup>[2]</sup>。本文利用免培养方法(PCR-DGGE 和 rRNA 分析法)对昆明盐矿中细菌和古菌多样性进行研究,以期更全面了解该环境中原核生物的多样性,为古老岩盐沉积微生物资源的深入研究、保护、开发与利用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集**: 2005 年 3 月,样品采自云南省昆

基金项目: 国家自然科学基金(30460004, 30660004, 30360004, 20362009, 30260004); 云南省自然科学基金项目(2004C0002Z, 2006C0006M); 云南省中青年学术带头人后备人才基金(2005PY01-1); 教育部留学回国人员启动基金; 云南省教育厅基金(5Y0199B)

\* 通讯作者。 Tel/Fax: 86-871-5034621; E-mail: xlcui@ynu.edu.cn xlcuiynu@yahoo.com.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: 杨亚玲<sup>2</sup>, 段东成<sup>4</sup>, 陈 维<sup>1</sup>, 邓 岚<sup>1</sup>, 李沁元<sup>3</sup>, 陈义光<sup>1</sup>, 王治刚<sup>1</sup>, 任 祺<sup>1</sup>, 刘继辉<sup>1</sup>

收稿日期: 2006-08-14 接受日期: 2006-09-14 修回日期: 2006-12-27

明盐矿(北纬 24°57', 东经 102°35') 3 个卤水沉淀池底部的盐晶和卤水混合物。沉淀池中卤水清亮, 肉眼可见池底盐晶。

**1.1.2 主要试剂、仪器和菌株:**溶菌酶和蛋白酶 K (上海华舜生物工程有限公司), 小量 DNA 胶回收试剂盒(上海生工生物工程技术服务有限公司), *Taq* 酶和内切酶(*Afa* I、*Hha* I、*Hae* III)(宝生物工程(大连)有限公司), pGEM-T Easy Vector System II 试剂盒(Promega, 德国), DCode System 和 PCR 仪(Bio-Rad, 美国)。本研究所用纯培养物由本实验室鉴定和保藏, 分离自昆明盐矿<sup>[2]</sup>。

## 1.2 样品总 DNA 的提取

采用酶解法结合化学裂解法<sup>[10, 11]</sup>从样品中提取总 DNA。步骤如下: 取 5g 样品(取自 3 个样点的样品等量混合)于 50mL 离心管中, 加入 5mL 无菌卤水, 充分振荡。静置 45s, 小心吸取液相中清亮层与浑浊层交界面的液体 2mL。再充分振荡, 静置 45s, 小心吸取交界面液体 2mL。补充卤水, 重复数次, 收集液体 15mL ~ 20mL。13000r/min 离心 10min, 弃上清。沉淀中加入 500 $\mu$ L 1 $\times$  TE, 10 $\mu$ L 溶菌酶溶液(25mg/mL), 混匀, 37 $^{\circ}$ C, 12h, 然后 13000r/min 离心 10min, 弃上清。沉淀中加入 500 $\mu$ L SDS (20%), 6 $\mu$ L 蛋白酶 K 溶液(10mg/mL) 混匀, 55 $^{\circ}$ C, 90min。酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提蛋白质。取上清, 加入等体积的异丙醇, 0.1 倍体积的 3mol/L 醋酸钠(pH5.0), 混匀, -20 $^{\circ}$ C, 2h。4 $^{\circ}$ C 13000r/min 离心 5min, 弃上清。70% 乙醇洗涤, 弃上清, 沉淀自然干燥, 加入 20 $\mu$ L 1 $\times$  TE 溶解。-20 $^{\circ}$ C 保存。

## 1.3 DGGE 分析

样品总 DNA 使用两组引物(表 1)分别扩增细菌和古菌 16S rDNA 的高变区片段。采用热启动、降落 PCR 扩增。细菌(引物:1406F-GC, 1055R): 95 $^{\circ}$ C 5min; 反应体系保持在 80 $^{\circ}$ C 加入 *Ex Taq* 酶; 95 $^{\circ}$ C 1min, 62 $^{\circ}$ C ~ 52 $^{\circ}$ C 1min(-1 $^{\circ}$ C/2 个循环), 72 $^{\circ}$ C 3min, 20 个循环; 95 $^{\circ}$ C 1min, 52 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 15 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。古菌(引物:ARC344F-GC, ARC915R)除降落温度为 65 $^{\circ}$ C ~ 55 $^{\circ}$ C 1min(-1 $^{\circ}$ C/2 个循环)外, 其他条件与细菌的一致。纯培养物使用同样引物以常规 PCR 扩增。PCR 产物纯化后备用。

样品和分离自昆明盐矿的纯培养物同时进行 DGGE 电泳, 聚丙烯酰胺凝胶浓度 6%, 变性梯度 30% ~ 60%(细菌)和 25% ~ 65%(古菌) 100% 变性剂为 7mol/L 尿素, 40% 甲酰胺, 120V, 60 $^{\circ}$ C 恒温, 1 $\times$  TAE 中电泳 8.0h, 溴化乙锭染色 15min, 1 $\times$  TAE 浸泡 10min, 凝胶成像系统拍照。

表 1 用于 16S rDNA 高变区片段扩增的引物

Table 1 The sequences of two sets of primers used to amplified variable sequence of 16S rDNA

Primer	Target site	Sequenc(5'→3')	Reference
1406F-GC*	1392-1406	ACGGGCGGTGTGTAC	[ 12 ]
1055R	1055-1070	ATGGCTGTCGTACGCT	[ 12 ]
ARC344F-GC	344-363	ACGGGGYGCAGCAGCGCGGA	[ 13 ]
ARC915R	915-934	GTGCTCCCCGCCAATTCCT	[ 13 ]

\* GC :A 40-nucleotide GC-rich sequence (GC clamp) was attached to the 5' end of primers. The sequence is 5'-CGCCCCCGCGCGCGCGGGGGGCGCGGGGGCACGGGGG-3'<sup>[14]</sup>.

## 1.4 16S rDNA 全序列的 PCR 扩增和纯化

样品总 DNA 采用热启动 PCR 扩增 16S rDNA 全序列 95 $^{\circ}$ C 5min; 反应体系保持在 80 $^{\circ}$ C 加入 *Ex Taq* 酶, 95 $^{\circ}$ C 1min, X $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 3min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10min。细菌引物分别以 52 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C、66 $^{\circ}$ C 为退火温度, 古菌引物分别以 50 $^{\circ}$ C、52 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、62 $^{\circ}$ C、64 $^{\circ}$ C 为退火温度。细菌引物<sup>[15]</sup> 27F :5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3' 和 1541R :5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。古菌引物<sup>[16]</sup> :25F :5'-ATTCCGGTTGATCCTGCCGG-3' 和 1521R :5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。等量混合各退火温度的 PCR 产物, 纯化后备用。

## 1.5 克隆文库构建和 ARDRA 分析

纯化后的样品 16S rDNA 全序列 PCR 产物 根据 pGEM-T Easy Vector System II 操作手册与 T 载体连接, 连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。阳性克隆以碱裂解法提取质粒, 载体特异引物 PCR 扩增获得 16S rDNA, 选用 3 种内切酶(*Afa* I、*Hha* I、*Hae* III)对 PCR 产物进行酶切。根据酶切图谱选择不同操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OUTs)的代表克隆送 TaKaRa 公司进行 DNA 序列测定。

## 1.6 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析

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, 从中获取相近的菌株 16S rDNA 序列, 用 Clustal X 程序按照最大同源性的原则进行排序, 采用 Kimura-2 计算核苷酸差异值, 并用 BioEdit 5.0.9 进行检验, 最后用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树, 自展数(bootstrap)为 1000。

# 2 结果

## 2.1 DGGE 分析

样品总 DNA 的提取是 16S rDNA 分析的基础和关键, 只有获得完整且适于 PCR 扩增的总 DNA 才能保证分析结果的准确、可靠。本研究结合酶裂解和化学裂解法从样品中获得了可直接进行 PCR 的总

DNA, DNA 片段大小 20kb 左右, 未见小片段, 表明该方法适于该样品的总 DNA 提取。PCR 扩增 16S rDNA 高变区序列, 无明显非特异性扩增, 片段大小约 320 bp (细菌) 和 590 bp (古菌)。

为了解纯培养所得菌株是否真实反映了该环境中微生物的群落结构, 采用 DGGE 分析样品和纯培养物。从细菌 DGGE 图谱(图 1:1~14)来看, 样品(图 1:9)共得到 12 条较亮的条带和 15 条较弱的条带, 这些条带代表了该环境中的优势菌群, 所以可初步认为昆明盐矿至少含有 27 种优势细菌。由于本研究所得的 DGGE 条带密集不易纯化, 所以采用将样品与纯培养物比较来说明条带的意义, 而对物种的确认则通过克隆法来进行。纯培养得到 18 个属的细菌(图 1:1~8 和 10~14, 其余 5 个属未给出)都集中在较窄的变性剂范围内(50%~57%), 只有 1 株地位不确定的菌株(图 1:6)与样品的 1 条亮带位置一致, 没有与其余 17 个属位置一致的样品 DGGE 条带。有的纯培养物(图 1:2 和 14)在 DGGE 图谱中出现 2 条带, 可能是因为这些纯培养物含有 2 个 16S rDNA 拷贝。此前的纯培养获得 2 株 *Halorubrum* 属的古菌<sup>[21]</sup>, DGGE 分析(图 1:15, 17)发现, 没有与这 2 株菌位置一致的样品 DGGE 条带(图 1:16)。这 2 个物种虽然在所提供的培养基上大量出现, 但可能也不是昆明盐矿中优势的古菌。样品古菌 DGGE 图谱

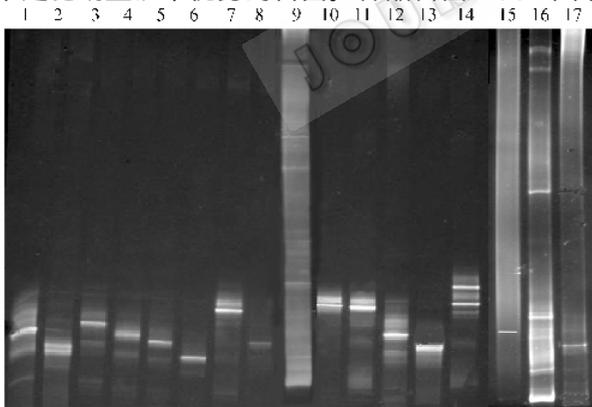


图 1 样品与纯培养物的 DGGE 图谱

Fig.1 The DGGE profiles of samples and pure culture strains. 1. *Microbacterium* sp. (YIM-KMY18). 2. *Streptomyces* sp. (YIM-KMY32). 3. *Rathayibacter* sp. (YIM-KMY34). 4. *Arthrobacter* sp. (YIM-KMY35). 5. *Arsenicococcus* sp. (YIM-KMY39). 6. unidentified strain (YIM-KMY41). 7. *Brevundimonas* sp. (YIM-KMY42-2). 8. *Cellulomonas* sp. (YIM-KMY49). 9. Total DNA (Bacteria). 10. *Halobacillus* sp. (YIM-DKMY34). 11. *Bacillus* sp. (YIM-DKMY44-1). 12. *Kocuria* sp. (YIM-DKMY51). 13. *Halomonas* sp. (YIM-DKMY 60). 14. *Oceanobacillus* sp. (YIM-DH3). 15. *Halorubrum* sp. (YIM-DT5). 16. Total DNA (Archaea). 17. *Halorubrum* sp. (YIM-DT6).

条带数少于细菌的, 只有 10 条较亮的条带, 8 条较淡的条带。表明该环境中古菌优势物种数少于细菌, 这与纯培养所得结果相同, 原因可能是该环境条件不利于古菌与细菌的竞争。

从上述结果来看, DGGE 条带所代表的菌群大多是不可培养或尚未培养的类型, 可培养的菌群其实并非该环境的优势菌群, 它们在样品中所占比例并不高, 只是因为它们更适合于所提供的培养基和培养条件才得以被培养和分离。大量不可培养或未培养的菌群才是样品中的优势类群。当然, 这一结论还需要其它实验结果(如 FISH)的支持。

## 2.2 克隆文库的构建和 ARDRA 分析

样品总 DNA 分别使用细菌和古菌 16S rDNA 特异性引物以 8 个梯度退火温度扩增 16S rDNA 全序列, 8 个退火温度都获得了约 1.5kb 的 DNA 片段, 较低温度(如 50°C, 52°C)时虽出现非特异性扩增, 通过胶回收可以去除这些非特异条带。多温度退火更准确地反映了样品中 16S rDNA 的组成情况, 保证了克隆文库的完整性。

从克隆文库中挑取 36 个细菌克隆和 20 个古菌克隆使用 *Afa* I、*Hha* I 和 *Hae* III 进行 ARDRA 分析。根据酶切图谱细菌可分为 10 个 OTUs, 其中 3 个优势 OTUs 分别占 36 个克隆的 38.9%、25.0%、16.7%, 其余 7 个 OTUs 的相对丰度均处于较低的水平, 仅含有 1 个克隆。古菌分为 8 个 OTUs, 每个 OTU 的克隆数相近(2~3 个), 没有明显的优势 OTU。分别将细菌和古菌不同 OTUs 的代表克隆 10 个和 8 个进行测序, 序列长度约 600bp。

## 2.3 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析

测序的 10 个细菌克隆分属 3 大类群:  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria 和 Actinobacteria(图 2-A, B)。

$\alpha$ -Proteobacteria 类群的 CS23 和 CS79 与未培养的  $\alpha$ -Proteobacterium 聚为一簇, 但形成不同的分支, 准确分类地位难以确定。ARDRA 分析中 CS23 和 CS79 具有与其它所有克隆都不同的酶切图谱也印证了它们在分类地位上的特殊性。CS23 和 CS79 所代表的 OTU 都只有 1 个克隆。纯培养中有 2 株菌属于该类群, 占 44 株细菌分离物的 4.6%。

$\gamma$ -Proteobacteria 类群是 36 个细菌克隆中最优势类群, 由 6 个 OTUs 组成, 其中 CS7 和 CS24 所代表的 OTU 分别含 14 个和 9 个克隆。该类群所有克隆都属于 *Pseudomonas*, 其中 CS7, CS27 和 CS64 系统进化关系相似, 与 *Pseudomonas halophila* (DSM 3050<sup>T</sup>) 聚为一簇。CS54 和 CS24-1 与目前所知的分离物差异较

大,是2株未培养的 *Pseudomonas* sp.。CS24 所代表的 OUT 含 9 个克隆,该克隆与目前已知序列存在较大差异,代表了一个新的较高级的分类单位,说明昆明盐矿含有很多未被认识的微生物新类群。 $\gamma$ -Proteobacteria 的 6 个克隆都与未培养的 *Pseudomonas* sp. 相近,表明样品中含有大量不可培养或未培养的 *Pseudomonas* sp. 纯培养研究未分离到这个属的菌株也有这方面的原因。纯培养研究中  $\gamma$ -Proteobacteria 类群包括 4 株 *Halomonas* 属的菌株<sup>[2]</sup>,占 9.1%,是分离物中较少的类群。

Actinobacteria 类群由 2 个 OTUs 组成,CS11 和 CS90 所代表的 OTU 分别含 6 个和 1 个克隆。CS11

和 CS90 都与分离自新疆盐碱土的 *Nocardiopsis rosea* (YIM90094<sup>T</sup>)<sup>[17]</sup> 较相似(相似性 99.3% 和 99.5%),但与分离自昆明盐矿的 *Nocardiopsis* sp. (YIM-KMY47-1<sup>T</sup>)<sup>[2]</sup> 处于不同分支。纯培养研究中有 14 株菌属于 Actinobacteria 类群,占 31.7%,是分离物中次优势的类群<sup>[2]</sup>。

测序的 8 个古菌克隆得到 5 条有效序列。5 个克隆都属于 Halobacteriaceae(盐杆菌科)(图 2-C, D),其中 SA23 与 *Halorubrum lacusprofundi* (ACAM34<sup>T</sup>) 聚为一簇(相似性 98.1%),SA4 和 SA15 与 *Haloterrigena saccharovitans* (JCM12889<sup>T</sup>) 聚为一簇(相似性 98.6% 和 98.7%),SA1 和 SA6 与目前的可培养古菌

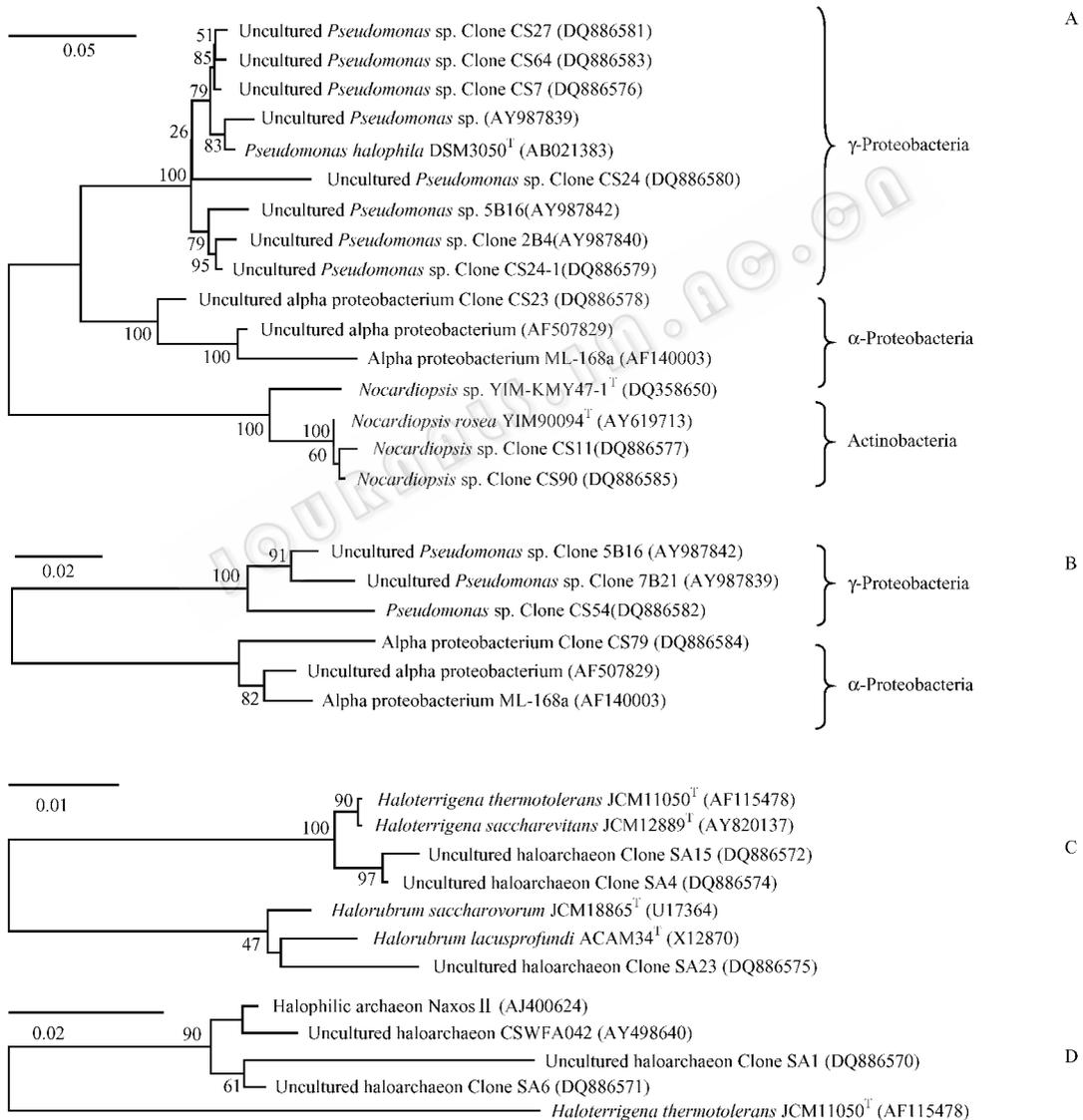


图 2 基于 16S rDNA 部分序列的昆明盐矿细菌和古菌克隆系统发育树(A, B, C, D)

Fig.2 Dendrograms for clones from the Kunming Salt Mine based on partial 16S rDNA sequences (A, B, C and D) showing the phylogenetic positions of these clones and phylogenetic relatedness to representatives of their closely related culturable taxa or uncultured microorganisms.

Data in parentheses are the GenBank accession numbers. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled datasets. The scale bars indicate five (A), two (B), one (C), two (D) substitution(s) per 100 nucleotide positions, respectively.

相似性较低,是2株未培养的古菌。纯培养中分离到的2株古菌都是 *Halorubrum* sp.<sup>[2]</sup>。

### 3 讨论

目前,大多研究者都认为嗜盐古菌是各类高盐环境的优势菌群<sup>[3]</sup>,而我们采用纯培养、DGGE和克隆文库分析都证实昆明盐矿中古菌数量和丰度都少于细菌。这也许是该环境的真实反映,也可能是所采用的培养条件和引物不适合该环境中古菌的分析,虽然所用引物被证实可扩增大部分古菌<sup>[12,13]</sup>,其原因值得深入研究。纯培养法分离得到的44株细菌分属4大类群: Firmicutes,  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, Actinobacteria<sup>[2]</sup>,但在克隆文库中,36个细菌克隆分属3大类群:  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria, Actinobacteria, 缺少纯培养中最优势的类群 Firmicutes,而以纯培养中未获得的 *Pseudomonas* 属菌为优势。 *Pseudomonas* spp. 具有广泛的适应性,在几乎所有类型的环境中都有其存在<sup>[18]</sup>。但并非在所有研究中都能得到这类菌。Hidetoshi<sup>[19]</sup>分离自海底沉积物的197个克隆中也没有 *Pseudomonas* spp.。Yeon<sup>[20]</sup>对韩国一晒盐池的纯培养研究也没有分离到 *Pseudomonas* spp.。对昆明盐矿的纯培养和免培养研究在物种组成和丰度上存在明显差异,这种差异也出现在 Burns<sup>[21]</sup>的研究中。因此,结合纯培养和免培养才能较客观、全面地了解环境中微生物多样性。

放线菌作为众多医用抗生素的产生菌始终受到研究者的重视。近年来嗜盐放线菌也受到了广泛的关注,大量嗜盐放线菌被分离<sup>[17,22]</sup>。在所构建的细菌文库中, Actinobacteria 类群含2个 OTUs,共7个克隆,在纯培养中也得到了14株 Actinobacteria 类群的菌株(31.7%)<sup>[2]</sup>,但在其它盐矿中没有获得放线菌,其原因也值得深入探讨。

以往的很多微生物生态学研究都局限于分离和鉴定环境中的微生物。这类方法对于了解微生物的多样性也提供了有价值的信息,但环境中的微生物只有很少部分能被培养,所以这些数据对于了解环境中微生物的群落结构只提供了非常有限的信息。将分子生物学应用于微生物生态学研究,特别是基于 rRNA 序列分析的方法,显示出可培养微生物中的优势类群并非环境中微生物的优势类群<sup>[23]</sup>。结合纯培养和免培养对盐矿古老岩盐沉积的研究必将有助于人们解决更多的理论和应用问题。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Vreeland RH, Piselli AFJ, McDonough SS, et al. Distribution and diversity of halophilic bacteria in a subsurface salt formation. *Extremophiles*, 1998, **2**(3): 321 - 331.
- [ 2 ] 肖 炜, 杨亚玲, 刘宏伟, 等. 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*. 2006 **46**(6): 967 - 972.
- [ 3 ] Meral B, Ayse O, Baris C, et al. Enzyme characteristics of extremely halophilic archaeal community in Tuzkoy Salt Mine, Turkey. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2004, **20**: 613 - 621.
- [ 4 ] Helga SL, Marion P, Andrea L. *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52**: 1807 - 1814.
- [ 5 ] 杨丽源, 李治滢, 李绍兰, 等. 一平浪盐矿耐盐真菌的种群调查. *云南大学学报(自然科学版)*, 2002, **24**(6): 465 - 468.
- [ 6 ] 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.
- [ 7 ] Norton CF, McGenity TJ, Grant WD. Archaeal halophiles (halobacteria) from two British salt mines. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**: 1077 - 1081.
- [ 8 ] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, **62**(2): 504 - 544.
- [ 9 ] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 1995, **59**: 143 - 169.
- [ 10 ] Krsek M, Wellington EMH. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, **39**: 1 - 16.
- [ 11 ] Miller DN, Bryant JE, Madsen EI, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(11): 4715 - 4724.
- [ 12 ] Ferris MJ, Muyzer G, Ward DM. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 340 - 346.
- [ 13 ] Emilio OC, Hendrik S, Lluís B. Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(2): 499 - 508.
- [ 14 ] Muyzer G, Waal EC, Uittlinden AG. 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.
- [ 15 ] 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.
- [ 16 ] Russell HV, Scott S, Jessica K, et al. *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and

- [ 17 ] Li W , Kroppenstedt RM , Wang D , *et al.* Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li *et al.* 2004. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2006 , **56** : 1089 – 1096.
- [ 18 ] Andrew JS , Angus B , Paul BR. The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* , 2000 , **146** : 2345 – 2350.
- [ 19 ] Hidetoshi U , Kumiko KT , Kouichi O. Microbial diversity in marine sediments from Segami Bay and Tokyo Bay , Japan , as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* , 1999 , **145** : 3305 – 3315.
- [ 20 ] Yeon SH , Jeong WJ , Park JS. The diversity of culturable organotrophic bacteria from local solar salterns. *J Microbiol* , 2005 , **43** ( 1 ) : 1 – 10.
- [ 21 ] 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 an Australian crystallizer pond are cultivable. *Appl Envir Microbiol* , 2004 , **70** : 5258 – 5265.
- [ 22 ] Schumann P , Cui XL , Stackebrandt E , *et al.* *Jonesia quinghaiensis* sp. nov. , a new member of the suborder *Micrococccineae* . *Int J Syst Evol Microbiol* , 2004 , **54** : 2181 – 2184.
- [ 23 ] Oren A. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* , 2002 , **39** : 1 – 7.

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

XIAO Wei<sup>1</sup> , PENG Qian<sup>1</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 , Yunnan University , Kunming 650091 , China )

(<sup>2</sup> Department of Biologic and Chemical Engineering , Kunming University of Science and Technology , Kunming 650224 , China )

(<sup>3</sup> Experiment Center of Life Sciences , Yunnan University , Kunming 650091 , China )

(<sup>4</sup> Yunnan Salt & Chemical Industry Co. , Ltd. , Kunming 650011 , China )

**Abstract** : The prokaryotic microbial diversity of the ancient salt deposits in the Kunming Salt Mine , P. R. China was investigated using PCR-DGGE and rRNA approaches. Total community DNA was extracted and purified by a direct method , which yielded amplified DNA of high molecular weight for samples. A variable region of 16S rRNA gene was then amplified by PCR with bacterial and archaeal primers and analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis ( DGGE ). Twenty-seven major bands were detected in the bacterial DGGE profile of the sample , but only one band of pure culture strains of bacteria isolated from the Kunming Salt Mine matched with one band of sample. No band of pure culture strains of archaea isolated from the Kunming Salt Mine matched with 18 major bands of sample. The results indicated that most of microbes in this environment are likely uncultivable. Clones on the plate were not the predominant species in the community. Two 16S rRNA gene clone libraries ( bacteria and archaea ) were also constructed , and 36 and 20 clones were selected for amplified ribosomal DNA restriction analysis ( ARDRA ). ARDRA with enzymes *Afa* I 、 *Hha* I 、 *Hae* III revealed 10 bacterial operational taxonomic units ( OTUs ) , with three most abundant OTUs accounting for 38.9% , 25.0% , 16.7% of all the bacterial 16S rDNA clones , respectively. The remaining 7 OTUs presented at low levels , were represented by a single clone. Eight archaeal OTUs were obtained but no predominant OTUs. Some clones were sequenced and each sequence was compared with all nucleotide sequences in GenBank database. Examination of 16S rDNA clones showed that the ancient salt deposits in the Kunming Salt Mine contained a phylogenetically diverse population of organisms from the *Bacteria* domain with members of three major lineages represented :  $\alpha$ -proteobacteria ,  $\gamma$ -Proteobacteria and Actinobacteria , especially *Pseudomonas* . Surprisingly , we recovered a variety of sequence closely related to Actinobacteria which was not found in other salt deposits. All of archaeal clones are from *Halorubrum* , *Haloterrigena* and uncultured archaea. The results of DGGE and clone library profiling analysis both indicated that microbial community of the Kunming Salt Mine had higher diversity. In this initial survey , our polyphasic approaches demonstrated that novel and uncultured microbes thrive in the ancient salt deposits of the Kunming Salt Mine. Molecular analysis of the microbial diversity in salt deposits provides foundation for better application of microbial resources.

**Keywords** : ancient salt deposits ; 16S rDNA ; PCR-DGGE ; clone library ; ARDRA ; prokaryotic microbial diversity

Foundation item : National Natural Science Foundation of China ( 30460004 , 30660004 , 30360004 , 20362009 , 30260004 ) ; SRF for ROCS , SEM ; Yunnan Provincial Sciences and Technology Department ( 2005PY01-1 , 2004C0002Z , 2006C0006M ) ; Yunnan Provincial Department of Education ( 5Y0199B )

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

Other authors : YANG Ya-ling<sup>2</sup> , DUAN Dong-cheng<sup>4</sup> , CHEN Wei<sup>4</sup> , DENG Lan<sup>1</sup> , LI Qin-yuan<sup>3</sup> , CHEN Yi-guang<sup>1</sup> , WANG Zhi-gang<sup>1</sup> , REN Zhen<sup>1</sup> , LIU Ji-hui<sup>1</sup>

Received : 14 August 2006 / Recepted : 14 September 2006 / Revised : 27 December 2006