

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

陈义光^{1,2} 李汇明¹ 李沁元³ 陈 维⁴ 崔晓龙^{1*}

(¹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)

(²吉首大学 生物资源与环境生态重点实验室 生态学研究所 吉首 416000)

(³云南大学生命科学实验教学中心 昆明 650091)

(⁴云南盐化股份有限公司 昆明 650011)

摘 要 运用纯培养法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对云南省一平浪盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌的多样性进行了研究。用补充 0.5~3.5 mol/L NaCl 的 MBA 和 ISP 2 琼脂培养基从卤水、岩盐和盐土样品中分离到 38 株细菌,用细菌通用引物进行 16S rRNA 基因扩增和序列测定,用相关软件进行序列相似性搜索、比对和系统发育分析。结果表明,38 个分离菌株可分为 31 个物种,属于 4 个大的系统发育类群(Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria) 17 个科、24 个属。多数菌株属于 Proteobacteria 门(18 株,47.3%; Gamma-Proteobacteria, 31.5%; Alpha-Proteobacteria, 15.8%) 和 Firmicutes 门(13 株,34.2%)。这些分离菌株中,至少有 3 个菌株可能代表 3 个不同属的 3 个新物种:Y3、Y15 和 Y25 分别代表 *Idiomarina* 属、*Salinicoccus* 属和 *Saccharosprillum* 属的新物种,而菌株 Y21 有可能代表 Staphylococcaceae 科的一个新属。从以上结果可以看出,一平浪盐矿古老岩盐沉积中存在较为丰富的微生物物种多样性和系统发育多样性,并且潜藏着新的微生物资源。

关键词: 古老岩盐沉积; 可培养细菌; 16S rRNA 基因; 系统发育分析; 细菌多样性; 一平浪盐矿

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 1001-6209(2007)04-0571-07

由于极端环境微生物(extremophiles)具有其独特的环境适应模式、特殊的生理机制、独特的基因类型,并有多种代谢产物可以加以利用,因而不仅成为了生命科学理论研究的理想材料,并且成为一类具有很大开发潜力的生物资源^[1]。盐环境作为地球上最大的极端环境,其中存在各种耐盐或嗜盐的微生物类群。近 30 年来各国学者对盐环境微生物各个方面进行了大量的研究,主要取得了两方面的成就,一是应用纯培养法(culture-dependent method)和多相分类技术(polyphasic taxonomy),发现和描述了许多新类群;二是应用免培养分析法(culture-independent method)揭示出盐环境中也还存在大量的不可或至今尚未培养微生物(as-yet uncultured microorganism)^[2-4]。盐矿的地下岩盐沉积是一类高盐极端环境(hypersaline extreme environment),是约 67~230 Ma(million years, 百万年)前的古海洋、湖泊经过蒸发、盐析作用和地质构造的变化而形成的。研

究表明,古老岩盐沉积中也存在大量的原核微生物,而且有其不同的微生物区系、起源、进化与适应模式^[5-10]。

一平浪盐矿位于云南省禄丰县一平浪镇,是云南省重要盐化工业基地之一,其古老岩盐沉积为内陆湖相沉积岩盐矿床,形成于白垩纪上白垩统至第三纪古新统的地质沉积,距今 67~137 Ma^[11]。一平浪盐矿最早于明朝万历年间开始开采,距今有 400 余年的开采历史。杨丽源等对一平浪永元井 200m 深的矿井坑道中的卤水、土壤和岩盐块样品的真菌区系研究表明,样品中存在丰富的真菌菌株^[12]。我们用嗜盐菌培养基对一平浪卤水与新开采的岩盐块进行的初步分离,发现其细菌多样性较高。为了进一步探明一平浪盐矿古老岩盐沉积中的微生物多样性,我室 2004 年来应用纯培养法和免培养法开展了一系列的研究。本文报道纯培养方面的研究结果。

基金项目:国家自然科学基金(30460004, 30660004, 30360004);国家“973 项目”——重点基础研究发展计划(2004CB719601);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

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-871-5034621; E-mail: xlculi@ynu.edu.cn, xlculiyun@yahoo.com.cn

作者简介: 陈义光(1965-)男,湖南人,副教授,研究方向为微生物生态学。E-mail: mchenjsu@tom.com

其他作者: 杨亚玲⁴, 彭 谦¹, 文孟良¹, 徐丽华¹, 邓 岚¹, 王治刚¹, 刘继辉¹, 任 祺¹, 肖 炜¹, 刘宏伟¹

收稿日期: 2006-12-18; 接受日期: 2007-01-12; 修回日期: 2007-05-19

1 材料和方法

1.1 主要试剂、仪器和培养基

DNA 提取和纯化、PCR 扩增所用酶、引物和试剂同文献[13]。MBA 购自 Difco 公司;ISP2 琼脂培养基^[14]配方为:蛋白胨 4g,酵母膏 4g,麦芽膏 5g,微量盐 1mL,琼脂 20g,水 1000mL,pH 7.2。微量盐配制:FeSO₄·7H₂O 0.1g,MnCl₂·4H₂O 0.1g,ZnSO₄·7H₂O 0.1g,K₂HPO₄ 0.05g,蒸馏水 1000mL。

1.2 样品采集和菌株分离

1.2.1 样品来源 样品于 2003 年 10 月采自云南省一平浪盐矿元永井(简称 YPL,以下同)纬度:25°18′,经度:101°54′,200 m 深的矿井。10 月初(秋季)矿井内温度 18~21℃,矿井内卤水 pH 值为 6.5~6.8,NaCl 饱和。岩盐层 NaCl 含量为 10%~51%,平均 29%;其次为 Na₂SO₄,达 5%~10%^[11]。进入矿井,按无菌操作要求,在新开采工作面用无菌塑料袋收集盐矿岩样(halite)和盐土样(saline soil),在卤水池用无菌三角瓶汲取卤水样(brine),每瓶留有 50~100mL 空气。样品带回实验室后 24h 内进行微生物分离培养。

1.2.2 样品处理 卤水样品直接用于分离。盐土样品混匀,取 10g 置于盛有 90mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中,在摇床上 120r/min 振荡 2h,制得盐土水溶液。岩盐样品的处理:选取多块较大、表面盐土较少的岩盐,用无菌水将表面盐土洗净,并溶解表层岩盐,置超净工作台上风干后,敲碎岩盐,取多块岩盐的中间部分研碎混匀,然后按盐土水溶液制备方法得到岩盐样品水溶液。以上过程均进行严格的无菌操作,尽量排除操作污染。

1.2.3 菌株分离和培养 在正式分离实验前,用 MBA、ISP 系列培养基^[13]、营养琼脂、高氏 1 号等培养基,添加系列浓度的 NaCl,在不同温度下培养,对采自盐矿的不同样品进行了分离预实验,发现用 MBA、ISP 2 作分离基础培养基,在 28℃ 培养所得到的分离菌落数量大、形态多。所以,确定用 MBA (marine broth agar, Difco) 和 ISP 2 琼脂培养基为分离基础培养基,添加 0、0.5、1、1.5、2.5 和 3.5mol/L NaCl 倒平板,取 0.2mL 一定浓度的样品稀释液涂布平板,于 28℃ 培养 7~28d,挑取单菌落进行四分区划线纯化。所得纯培养物制成冻干牛奶管和斜面保藏于 4℃ 备用。

1.3 16S rRNA 基因序列测定和系统发育分析

总 DNA 的提取、16S rRNA 基因的 PCR 扩增、

PCR 产物纯化和序列测定按 Cui 等^[15]使用的方法进行。扩增和测序均用细菌通用引物:正向引物 PA (8-27f:5′-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3′)和反向引物 PB (1523-1504r:5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′)。根据测序结果,用 Blast 搜索程序从 GenBank 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 进行多序列比对^[16],系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算^[17],用 MEGA 3.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件包采用邻接法 (Neighbor-Joining) 进行聚类分析和构建系统进化树^[18]。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^[19]。

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区划线纯化,用显微镜检查纯化情况,最终从本次采集的样品中分离到 38 株纯培养物。从各样品分离效果看,卤水样中可培养细菌最丰富(29 株,76.3%),岩盐和盐土样品中数量较少(岩盐样品 5 株,13.2%;盐土样品 4 株,10.5%)。从不同培养基分离效果来看,以添加 0.5~2mol/L NaCl 的 MBA 培养基分离到的菌落最多,菌落形态较丰富,而添加 2.5mol/L 和 3.5mol/L NaCl 的 MBA 和 ISP 2 培养基菌落形成单位少,且菌落形态单一。说明样品中可培养微生物以耐盐菌为主,嗜盐菌相对较少。

2.2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育多样性分析

用 PA 为正向引物测定了所有 38 个分离菌株的 16S rRNA 基因 5′ 端部分序列(600~650bp)。用 Blast 搜索软件从 GenBank、EMBL 和 DDBJ 等公共数据库中进行相似性搜索,调出相似性最高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列(表 1),并调出相关属有效发表种典型菌株的有效序列,用相关软件进行序列比对、相似性计算、进化距离矩阵计算、聚类分析和系统进化树构建等系统发育分析(进化树在此未给出),主要结果见表 1 和表 2。结果表明,这 38 个分离菌株属于细菌域的 4 个大的系统发育类群(Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria) 17 个科 (Alteromonadaceae, Bacillaceae, Caulobacteraceae, Flavobacteriaceae, Halomonadaceae, Idiomarinaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaleae, Moraxellaceae,

Planococcaceae, Pseudomonadaceae, Rhodobacteraceae, *Exiguobacterium*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Kocuria*,
 Dietziaceae, Saccharospirillaceae, Sphingomonadaceae, *Marinobacter*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Planomicrobium*,
 Staphylococcaceae, Streptomycetaceae) 24 个属 (*Acinetobacter*, *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Saccharospirillum*, *Salegentibacter*, *Salinicoccus*,
Brevundimonas, *Chromohalobacter*, *Dietzia*, *Erythrobacter*, *Streptomyces*)

表 1 分离自一平浪卤水、盐土和岩盐的菌株和与其系统发育关系最密切的菌株

Table 1 Phylogenetic nearest neighbors of strains isolated from YPL-brine, saline soil and halite samples as determined by analysis of the first 600 nucleotides of the 16S rRNA gene sequence

Strain (accession number)*	Sample	Nearest phylogenetic neighbor in the 16S rRNA gene sequence database (accession number)	Similarity /%
Gamma-Proteobacteria			
Y23 (EF177662)	Brine	<i>Marinobacter</i> sp. 407-13 (AJ294359)	99.5
R10 (EF177663)	Brine	<i>Marinobacter</i> sp. DG893 (AY258110)	99.8
R22 (EF177664)	Brine	<i>Marinobacter</i> sp. 407-13 (AJ294359)	99.8
Y3 (EF177665)	Brine	<i>Idiomarina loihiensis</i> (AY505529)	95.9
Y24 (EF177666)	Brine	<i>Idiomarina loihiensis</i> (AY505529)	99.5
Y18 (EF177667)	Brine	<i>Halomonas nitritophilus</i> (AJ309564)	98.5
Y19 (EF177668)	Brine	<i>Halomonas magadiensis</i> (AY179189)	97.3
R24 (EF177669)	Brine	<i>Pseudomonas</i> sp. BHP7-11 (AY162141)	100
Y25 (EF177670)	Brine	<i>Saccharospirillum impatiens</i> (AJ315983)	95.5
Y29 (EF177671)	Brine	<i>Psychrobacter jeotgali</i> (AF441202)	99.1
Y30 (EF177672)	Brine	<i>Chromohalobacter</i> sp. IA1-Ch2 (AB189308)	98.3
Y8 (EF177673)	Saline soil	<i>Acinetobacter luoffii</i> (X81665)	97.8
Alpha-Proteobacteria			
Y26 (EF177674)	Brine	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (AY169433)	97.8
Y10 (EF177675)	Halite	<i>Brevundimonas bullata</i> (AB023428)	98.5
R14 (EF177676)	Brine	<i>Erythrobacter citreus</i> (AF118020)	99.1
Y5 (EF177677)	Brine	Uncultured alpha proteobacterium (AJ640149)	99.7
Y13 (EF177678)	Brine	<i>Paracoccus marcusii</i> (Y12703)	100
Y12 (EF177679)	Halite	<i>Porphyrobacter tepidarius</i> (AF465839)	97.3
Bacteroidetes			
R11 (EF177680)	Brine	<i>Salegentibacter nodsonii</i> (AY576653)	97.5
Firmicutes			
Y1 (EF177681)	Brine	<i>Bacillus pumilus</i> (AY456263)	99.2
R4 (EF177682)	Brine	<i>Bacillus horikoshii</i> (AB043865)	98.8
R6 (EF177683)	Brine	<i>Bacillus pumilus</i> (AY373359)	100
R13 (EF177684)	Brine	<i>Bacillus</i> sp. YY (AF414443)	99.5
Y27 (EF177685)	Halite	<i>Bacillus pumilus</i> (AY456263)	100
Y28 (EF177686)	Halite	<i>Bacillus pumilus</i> (AY456263)	99.7
Y15 (DQ837380)	Brine	<i>Salinicoccus marinus</i> (AY328901)	92.2
Y16 (EF177687)	Brine	<i>Salinicoccus marinus</i> (AY328901)	92.5
Y17 (EF177688)	Brine	<i>Salinicoccus roseus</i> (X94559)	98.6
Y22 (EF177689)	Brine	<i>Salinicoccus roseus</i> (AF237976)	92.1
Y11 (EF177690)	Halite	<i>Exiguobacterium</i> sp. B10 (AJ518821)	99.6
Y7 (EF177691)	Saline soil	<i>Planomicrobium okeanoikoites</i> (D55729)	99.4
Y21 (EF177692)	Brine	<i>Salinicoccus roseus</i> (AF237976)	92.8
Actinobacteria			
Y14 (EF177693)	Brine	<i>Agromyces allium</i> (DQ673873)	98.9
R17 (EF177694)	Brine	<i>Arthrobacter bergeri</i> (AJ609633)	99.8
Y31 (EF177695)	Brine	<i>Kocuria</i> sp. JL-72 (AY745813)	99.8
Y32 (EF177696)	Brine	<i>Dietzia maris</i> (Y18883)	99.8
Y6 (EF177697)	Saline soil	<i>Micrococcus luteus</i> (AJ409096)	98.9
R3 (EF177698)	Saline soil	<i>Streptomyces</i> sp. YIM8 (AF389344)	100

* Strains marked in bold were used for phylogenetic analysis as showed in Fig. 1.

多数菌株属于 Proteobacteria 门(18 株 47.3%。其中 Gamma-Proteobacteria, 12 株, 31.5%; Alpha-Proteobacteria, 6 株 15.8%)和 Firmicutes 门(13 株, 34.2%)。还有 6 株属于 Actinobacteria 门, 只有 1 株分离自卤水的 R11 属于 Bacteroidetes 门。在 24 个属中, *Bacillus* 和 *Salinicoccus* 属各分离到 4 株, *Marinobacter* 属 3 株, *Halomonas* 属 2 株, *Idiomarina* 属 2 株, 其它 20 个属各分离到 1 株。按 16S rRNA

表 2 分离自一平浪卤水、盐土和岩盐的菌株所属类群分析

Table 2 Taxon affiliation and percentage distribution of strains isolated from YPL-brine, saline soil and halite samples as determined by 16S rRNA gene sequence analysis

Phylogenetic group	No. of family	No. of genus	Brine sample		Saline soil sample		Halite sample	
			No. of isolates (%)	No. of isolates (%)	No. of isolates (%)	No. of isolates (%)		
Gamma-Proteobacteria	6	8	11 (28.9)	1 (2.6)	0			
Alpha-Proteobacteria	3	5	4 (10.5)	0	2 (5.3)			
Bacteroidetes	1	1	1 (2.6)	0	0			
Firmicutes	3	4	9 (23.7)	1 (2.6)	3 (7.9)			
Actinobacteria	4	6	4 (10.5)	2 (5.3)	0			
Total	17	24	29 (76.3)	4 (10.5)	5 (13.2)			

基于分离菌株部分 16S rRNA 基因序列(约 600bp)的 Blast 搜索结果(表 1)和系统发育分析结果(未列出)表明,一些菌株的 16S rRNA 基因序列与相关有效发表种典型菌株的序列存在较大差异。为了进一步确定这些分离菌株与相关有效发表种典型菌株之间的系统进化关系,用 PA 和 PB 为引物,测定了部分菌株的 16S rRNA 基因全序列(约 1500bp),并且与相关典型菌株的有效序列进行比对,构建系统进化树(图 1)。

按 16S rRNA 基因序列相似性大于 97% 的菌株属于同一物种估算^[20], 18 株测定了 16S rRNA 基因全序列的分离菌株中,有 14 株为相关属有效发表种的不同菌株,至少有 4 株代表潜在新种或新属。与 Y3 系统发育关系最密切的是 *Idiomarina loihiensis* DSM 15497^T, 与 Y15 最密切的是 *Salinicoccus alkaliphilus* JCM 11311^T, 与 Y25 最密切的是 *Saccharospirillum impatiens* DSM 12546^T, 它们之间的序列相似性分别为 95.9%、96.3% 和 96.9%。所以,可以初步认为 Y3、Y15 和 Y25 分别代表 *Idiomarina* 属、*Salinicoccus* 属和 *Saccharospirillum* 属的潜在新种(potential novel species)^[20]。Y21 与其系统发育关系最近的 *Salinicoccus* 属的 3 个有效发表种典型菌株之间、以及与这次分离的菌株 Y15 之间的 16S rRNA 基因序列相似性小于 95% (similarity, 93.2% ~ 93.8%) 并且在系统进化树中以较高的自展值

基因序列相似性大于 97% 的菌株归于同一物种计^[20], 38 个分离菌株可以归为 31 个物种。除了 R6、R24、Y13、Y27 与其相关菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 100% 外,其它分离菌株的 16S rRNA 基因部分序列与其相关菌株的序列相似性在 92.8% ~ 99.8% 之间,说明大部分菌株与其系统发育关系最密切的相关菌株之间存在较大的遗传差异。

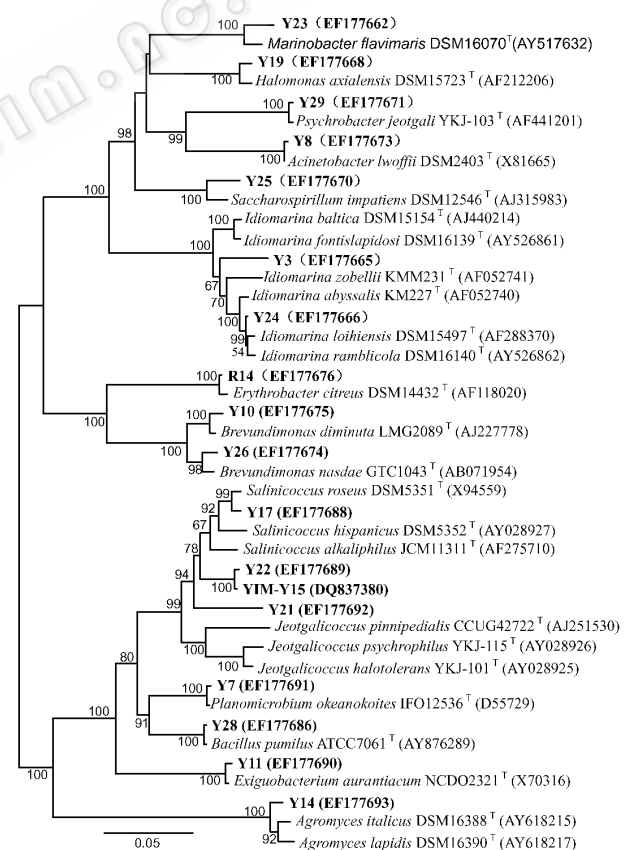


图 1 部分一平浪盐矿分离菌株及其从 GenBank 等数据库中调集的相关菌株构建的以 16S rRNA 基因序列为基础的系统进化树

Fig. 1 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences obtained from the YPL isolates and their closely related sequences downloaded from GenBank etc. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values (> 50%) based on neighbour-joining analyses of 1 000 resampled data sets. Bar = 5 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

(bootstrap value, 98%)支持形成一个独立分支(图1),有可能代表 Staphylococcaceae 科的一个新属^[21]。当然,要最终确定以上菌株的分类地位,还需要结合形态特征、生理生化特征、细胞化学特征,以及与典型菌株基因组间的 DNA-DNA 同源性比较等研究结果。这些菌株的多相分类(polyphasic taxonomy)研究正在进行中(另文发表)。

3 讨论

3.1 较为丰富的盐矿高盐环境微生物多样性

由于原核微生物的微观性、单细胞结构、快速的无性繁殖方式,以及在环境中与种类繁多的其它生物混居,难以对其形态多样性、群落多样性和生态多样性加以准确描述,因而,原核微生物的多样性研究主要集中在遗传多样性(genetic diversity)、物种多样性(species diversity)、进化分支多样性(diversity of phylogenetic lines)和生理代谢类型多样性(physiological diversity)方面^[22]。本文采用基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对一平浪古老岩盐沉积中可培养细菌的多样性进行研究,发现其微生物多样性较丰富。分离到的 38 株菌归属于 4 个大的系统发育群、17 个科、24 个属,可以分为 31 个物种,其中至少有 4 株(Y3, Y15, Y21, Y25)代表潜在新种或新属。而且,大部分分离菌株与其系统发育关系最密切的菌株之间的 16S rRNA 基因序列都有一定差异。这些结果揭示了一平浪盐矿古老岩盐沉积中的可培养微生物较丰富的多样性,说明古老岩盐沉积这类极端高盐环境也是微生物物种形成与演化的主要生境之一。

3.2 微环境代表性样品微生物多样性具有较大差异

对各样品的分离菌株进行对比分析,发现各样品中可培养细菌的多样性是极不均一的(表1,表2)。从卤水样品中不仅分离到了数量最多的菌株(76.3%),而且这些菌株分属于分离到的所有 24 个属中。从盐土样品中分离到 Gamma-Proteobacteria 亚群 Moraxellaceae 科 *Acinetobacte* 属 1 株、Firmicutes 门 Planococcaceae 科 *Planomicrobium* 属 1 株,以及 Actinobacteria 门 Micrococcaceae 科 *Micrococcus* 属和 Streptomycetaceae 科 *Streptomyces* 属各 1 株。盐土样品中可培养细菌多样性大大不如卤水样品。而从岩盐样品分离的菌株更为单一,只分离到 Alpha-

Proteobacteria 亚群中 Caulobacteraceae 科 *Brevundimonas* 属和 Erythrobacteraceae 科 *Porphyrobacter* 属菌株各 1 株,以及 Bacteroidetes 门 Bacillaceae 科中 *Bacillus* 属 2 株、*Exiguobacterium* 属 1 株。这次岩盐和盐土样品是距离地面 200 m 的井下新开采断面采集,没有受到地面微生物污染,分离结果能较真实地反映出岩盐和盐土样品中可培养微生物的丰度。岩盐样品因为缺少水分和极端高盐不利于微生物的生长繁殖,在盐矿形成时包埋其中的微生物可能要么以休眠体形式存在,要么在长期的盐矿形成过程或岩盐沉积形成后的某个地质年代中死亡(岩盐沉积为白垩纪上白垩统至第三纪古新统的地质沉积,距今 137-67 Ma^[10])。盐土样品中有岩盐碎块、岩盐蚀溶物和地下渗透水,其中的微生物也就有这几个方面的来源,并且由于地下水的渗透,其中的微生物有可能缓慢繁殖、演化,因而盐土比岩盐含有较多样的微生物类群。而卤水样品是 400 多年来开采出来的岩盐和盐土溶解在地下渗透水和地面人工补充水中而形成,一方面,历年开采的岩盐和盐土中的微生物和地下渗透水中原有的微生物在卤水中积累,并且卤水的盐度和水分条件比岩盐和盐土适宜微生物的生长、繁殖和演化,这可能是形成卤水中微生物多样性的主要原因;另一方面,地面人工补水溶盐取卤的开矿方式也把地面水中的微生物带入了卤水样品中,可能造成卤水样品微生物多样性的增加。

3.3 现代微生物生态学研究的策略-纯培养和免培养研究并重

在微生物多样性研究中,纯培养法(culture-dependent method)和免培养(分析)法(culture-independent method)孰优孰劣,一直是一个受到争论的问题^[23]。的确,免培养分析法中各种现代分子生物学方法的运用,使人们能够对环境中的微生物多样性有更全面、更准确的了解,尤其使人们认识到了自然界中还存在极大量的未培养微生物。毫无疑问,免培养分析法已经成为现代微生物生态学研究不可缺少的方法。但是,环境中这些未培养或难培养微生物,只有利用纯培养法,得到纯培养后,才能对其进行更好的分类学和其它理论研究,也才能更好地用于应用研究和开发利用。并且,只要投入足够的时间和努力,没有培养不了的微生物^[24, 25]。因此,许多学者建议目前更应该加强纯培养的研究^[26-30],以期更全面地了解微生物的多样性和更好

地利用这些自然资源。本文的研究结果表明, 纯培养法不仅揭示了一平浪古老岩盐沉积中存在较丰富的微生物多样性, 而且直接得到了这些宝贵的微生物资源, 为进一步的理论研究和开发利用打下了基础。当然, 为了更全面的了解一平浪古老岩盐沉积中的微生物多样性, 除了进一步加强纯培养研究外, 我们正在应用 DGGE 分析、荧光原位杂交等免培养分析技术进行深入研究。

致谢 感谢云南盐化股份公司职工王熙、杨云玉、关红昌、任连武、潘光兴、李亚杰、杨卫红、董亚仲、李文忠在样品采集时给予的帮助; 感谢云南省微生物研究所实验员段丽霞在实验过程中的协助。

参 考 文 献

- [1] 刘志恒. 现代微生物学. 北京: 科学出版社, 2002. 186 - 238.
- [2] 任培根, 周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展. 微生物学报, 2003 43(3): 427 - 431.
- [3] Vorigas C, Antranikian G. Extremophiles: pH, temperature, and salinity. In: Bull TA ed. Microbial Diversity and Bioprospecting. Washington, DC: ASM Press, American Society for Microbiology, 2004, 146 - 153.
- [4] Stackebrandt E, Embley TM. Diversity of uncultured microorganisms in the environment. In: Colwell RR and Grimes DJ, ed. Nonculturable Microorganisms in the Environment. Washington, D. C.: ASM Press, 2000, 57 - 75.
- [5] Norton CF, McGenety TJ, Gmt WD. Archaeal halophiles (halobacteria) from two British salt mines. J gen Microbiol, 1993, 139: 1077 - 1081.
- [6] Grant WD, Gemmell RT, McGenety TJ. Halobacteria—the evidence for longevity. Extremophiles, 1998, 2(3): 279 - 288.
- [7] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62: 504 - 544.
- [8] McGenety TJ, Gemmell RT, Grant WD, et al. Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. Environ Microbiol, 2000, 2(3): 243 - 250.
- [9] Vreeland RH, Powers DW. Considerations for microbiological sampling of crystals from ancient salt formations. In: Oren A. ed. Microbiology and Biogeochemistry of Hypersaline Environments. Boca Raton: CRC Press, 1999, 53 - 73.
- [10] 肖 炜, 杨亚玲, 刘宏伟, 等. 昆明古老盐矿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.
- [11] 云南省地方志编纂委员会. 云南省志(卷十九, 盐矿志). 昆明: 云南人民出版社, 1993, 63 - 65.
- [12] 杨丽源, 李治滢, 李绍兰, 等. 一平浪耐盐真菌的种群调查. 云南大学学报, 2002 30(4): 314 - 317.
- [13] 陈义光, 李文均, 崔晓龙, 等. 具抗肿瘤活性放线菌菌株 YIM 90022 的分离和系统发育分析. 微生物学报, 2006 46(5): 696 - 701.
- [14] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces species. Int J Syst Bacteriol, 1966, 16: 313 - 340.
- [15] Cui XL, Mao P, Zeng M, et al. Streptimonospora salina gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiopsaceae. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 357 - 363.
- [16] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 1997, 24(4): 876 - 488.
- [17] 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.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406 - 425.
- [19] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution, 1985, 39: 783 - 791.
- [20] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 846 - 849.
- [21] Goodfellow M, O' Donnell AG. Handbook of new bacterial systematics. London: Academic Press, 1993.
- [22] 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.
- [23] 崔晓龙, 徐丽华, 姜成林. 分子生态学. 见: 刘志恒, 姜成林主编, 放线菌现代生物学与生物技术. 北京: 科学出版社, 2004, 161 - 212.
- [24] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 1995, 59: 143 - 169.
- [25] Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science, 1997, 276: 734 - 740.
- [26] Fry JC. Culture-dependent microbiology. In: Bull TA. ed. Microbial Diversity and Bioprospecting. Washington, DC: ASM Press, American Society for Microbiology, 2004, 80 - 87.
- [27] Miteva VI, Sheridan PP, Brenchley JE. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(1): 202 - 213.
- [28] Stackebrandt E, Tindall BJ. Appreciating microbial diversity: rediscovering the importance of isolation and characterization of microorganism. Environ Microbiol, 2000, 2: 9 - 10.
- [29] Breznak JA. A need to retrieve the not-yet-cultured majority. Environ Microbiol, 2002, 4: 4 - 5.
- [30] Zinder SH. The future for culturing environmental organism: a golden era ahead? Environ Microbiol, 2002, 4: 14 - 15.

Phylogenetic diversity of culturable bacteria in the ancient salt deposits of the Yipinglang Salt Mine ,P. R. China

CHEN Yi-guang^{1,2}, LI Hui-ming¹, LI Qin-yuan³, CHEN Wei⁴, CUI Xiao-Long^{1*}

(¹ Yunnan Institute of Microbiology and Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China)

(² Key Laboratory of Bio-resources and Environmental Ecology, Institute of Ecology, Jishou University, Jishou 416000, China)

(³ Experiment Center of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

(⁴ Yunnan Salt & Chemical Industry Co., Ltd., Kunming 650091, China)

Abstract The microbial diversity of cultivable bacteria isolated from the ancient salt deposits from the Yipinglang Salt Mine (YPL) in the Yunnan Province, P. R. China, was investigated by using conventional culture-dependent method and phylogenetic analyses based on 16S rRNA gene sequence comparisons. 38 bacteria strains were isolated from the brine, halite and saline soil samples on MBA (marine broth agar 2216, Difco) and ISP 2 (International Streptomyces Project medium 2) media supplemented with 0.5 ~ 3.5 mol/L NaCl. The genomic DNAs of the isolates were extracted and their 16S rRNA genes were amplified by PCR using bacterial universal primers. The resulting 16S rRNA gene sequences were compared with sequences obtained from public databases to find the most closely related species. Phylogenetic analyses were performed using the software packages MEGA after multiple alignment of sequence data by CLUSTAL X. The evolutionary instances (corrected by Kimura's 2-parameter model) were calculated and clustering was performed with the neighbor-joining method. The results showed that the isolates are members of twenty-four genera (*Acinetobacter*, *Agromyces*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Chromohalobacter*, *Dietzia*, *Erythrobacter*, *Exiguobacterium*, *Halomonas*, *Idiomarina*, *Kocuria*, *Marinobacter*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Planomicrobium*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Roseivivax*, *Saccharospirillum*, *Salegentibacter*, *Salinicoccus*, *Streptomyces*) of seventeen families (Alteromonadaceae, Bacillaceae, Caulobacteraceae, Flavobacteriaceae, Halomonadaceae, Idiomarinaceae, Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Moraxellaceae, Planococcaceae, Pseudomonadaceae, Rhodobacteraceae, Dietziaceae, Saccharospirillaceae, Sphingomonadaceae, Staphylococcaceae, Streptomycetaceae) in four major phylogenetic groups (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria). The most abundant and diverse isolates were within the phyla of Proteobacteria (47.3%; Gamma-Proteobacteria 31.5%; Alpha-Proteobacteria 15.8%) and Firmicutes (34.2%). The phylogenetic distance matrix results suggested that out of 38 isolates 32 are different strains of 27 known species, and that at least 3 strains represent new species within 3 characterized genera. Y3 (Accession No. EF177665) and Y25 (EF177670) represent new species of the genera *Idiomarina* and *Saccharospirillum*, respectively. Y15 (DQ837380), Y16 (EF177680) and Y22 (EF177689) represent a new species of the genus *Salinicoccus*. And strain Y21 (EF177692) may represent a novel species of a possible new genus of the family *Staphylococcaceae*. The results presented above shown that there are abundant bacterial species diversity and phylogenetic diversity in the ancient salt deposits from the Yipinglang Salt Mine.

Keywords: ancient salt deposits; cultivable bacteria; 16S rRNA gene; phylogenetic analysis; bacterial diversity; Yipinglang Salt Mine

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30460004, 30660004, 30360004); Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719601); Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars of the State Education Ministry; Yunnan Provincial Sciences and Technology Department (2005PY01-1, 2004C0002Z, 2006C0006M)

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

Other authors: YANG Ya-ling⁴, PENG Qian¹, WEN Meng-liang¹, XU Li-hua¹, DENG Lan¹, WANG Zhi-gang¹, LIU Ji-hui¹, REN Zhen¹, XIAO Wei¹, LIU Hong-wei¹

Received: 18 December 2006/Accepted: 12 January 2007/Revised: 19 May 2007