

## 云南盐矿中病毒样颗粒的多样性

赵琴<sup>1</sup>, 任鹏康<sup>1,2</sup>, 王永霞<sup>1</sup>, 李治滢<sup>1</sup>, 吴鸣<sup>3</sup>, 肖炜<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, 教育部西南微生物多样性重点实验室, 云南 昆明 650091

<sup>2</sup> 广东海洋大学, 实验教学部现代生化中心, 广东 湛江 524088

<sup>3</sup> 云南省盐业产品质量检验站, 云南 昆明 650011

**摘要:** 【目的】了解云南盐矿中病毒样颗粒的多样性及特征, 为丰富嗜盐菌病毒资源及其生态功能研究奠定基础。【方法】采用电子显微镜直接观察、双层平板分离纯化对云南 5 个盐矿样品病毒的分布和形态特征进行比较研究。【结果】电镜观察病毒富集液表明, 其中含有 3 种不同形态的病毒样颗粒(头尾形、丝状、球状)。同时, 分离获得 3 株嗜盐细菌病毒, 其中 2 株感染盐单胞菌 (*Halomonas* sp.), 1 株感染色盐杆菌 (*Chromoha lobacter* sp.), 分别命名为 QHHSV-1、YPHSV-1 及 YPCPV-1。QHHSV-1 形成边缘清晰、透明的噬菌斑, 出斑时间约为 8 h, 培养 24 h, 其噬菌斑直径可达 3 mm, 电镜观察显示, QHHSV-1 呈头尾形, 头部直径约为 47 nm, 其尾部极易断裂, 长约 75 nm; YPHSV-1 形成边缘清晰、透明的噬菌斑, 出斑时间约为 12 h, 培养 24 h, 其噬菌斑直径可达 1 mm, 电镜观察显示, YPHSV-1 呈头尾形, 头部直径约为 50 nm, 尾长约为 140 nm; YPCPV-1 形成边缘模糊、透光亦不易见的噬菌斑, 出斑时间约为 72 h, 培养 96 h, 其噬菌斑直径可达 2 - 4 mm, 电镜观察显示, YPCPV-1 呈球形, 是表面有突起的多态形病毒, 大小为 20 - 50 nm。

**关键词:** 盐矿, 病毒, 多样性, 细菌

**中图分类号:** X172      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 10-1327-09

病毒不仅感染真核生物同时也感染原核生物(细菌和古菌), 由于原核生物的数量远远多于真核生物, 因此感染原核生物的病毒也成为生物圈中最为丰富和多样的生命体<sup>[1]</sup>。病毒的高感染率为原核生物间的基因水平转移提供了丰富而多样的遗传资源, 对基因组的进化、致病性和耐药性具有非常关键的作用<sup>[2]</sup>。对病毒的研究有助于增加人们对生命的起源与进化、生命本质及环境适应策略等的认识<sup>[3]</sup>。近几十年来, 极端环境中病毒的研究一直是全球热点之一<sup>[4]</sup>。1974 年, Torsvik 和 Dundas 从盐

沼盐杆菌 (*Halobacterium salinarium*) 中分离出第一株嗜盐古菌病毒 Hs1<sup>[5]</sup>。目前, 已报道的嗜盐菌病毒大多都是感染古菌, 尽管高盐环境中同样蕴含着大量而多样的嗜盐细菌, 但相对于嗜盐古菌病毒而言, 嗜盐细菌病毒的研究开展得较少。早期发现的细菌病毒及古菌病毒形态多为头尾形, 但近年来的电镜观察显示, 在高盐环境样品中, 病毒颗粒呈现出较为丰富的形态多样性, 如多态形病毒、水滴状和瓶状病毒等<sup>[6]</sup>。

人们一般将盐浓度高于海水浓度、甚至达到盐

**基金项目:** 国家自然科学基金(31200138, 31160123); 云南省自然科学基金(2014FB104, 2009DA002); 云南大学生命科学学院(2013S202)

\* 通信作者。崔晓龙, Tel/Fax: +86-871-65033543, E-mail: xlcui@ynu.edu.cn; 肖炜, weixiao@ynu.edu.cn

**作者简介:** 赵琴(1986 -), 女, 云南昭通人, 硕士研究生, 主要从事极端环境微生物学研究。E-mail: 277743936@qq.com

**收稿日期:** 2015-01-14; **修回日期:** 2015-03-04

饱和浓度的环境称为高盐环境,生活在这一类栖息地的微生物被称为嗜盐菌或嗜盐微生物<sup>[7-8]</sup>,包括细菌、古菌和真菌。由于嗜盐微生物在工业、农业、医疗等领域具有广泛的应用价值<sup>[7]</sup>,已经成为发达国家竞相占有和发掘的重要战略资源。国内研究人员张子千、梅运军等通过诱导的方法从分离自湖北应城盐矿盐岩样品的古菌(*Natrinema* sp.)中分离获得球形的溶源病毒 SNJ1<sup>[9-10]</sup>,这是首次从嗜盐古菌 *Natrinema* 属中获得的病毒。马延和与多国科学家合作对中国内蒙古 Bagaejinnor 盐湖中分离到的感染喜糖盐红菌(*Halorubrum saccharovorum*)的病毒 BJI 进行了基因组测序和解析<sup>[11]</sup>。目前,全球从高盐环境中已分离得到的 100 余株嗜盐菌病毒只占 6300 余种原核生物病毒的不到 1.6%<sup>[12]</sup>,从形态上这些病毒大致可分为头尾状、球状(多面体)、丝状和多态形 4 种类型。可见,高盐环境中病毒分布广泛、种类丰富,众多的嗜盐菌病毒有待于我们进一步发现。盐矿也是一类极端高盐环境,云南特殊的地质构造形成了盐矿集中分布的特性。云南盐矿作为我国陆地高盐环境的重要组成部分,迄今未见其中病毒多样性的研究报道。

本实验室前期研究表明,云南多座盐矿中嗜盐微生物较为丰富<sup>[13-15]</sup>。那么,其中是否存在病毒以及其多样性又如何呢?本文报道了云南 5 个盐矿中病毒样颗粒多样性,并分离获得 3 株细菌病毒,这不但为探索盐矿病毒的多样性及其地域特征奠定了基础,而且丰富了我国乃至世界的嗜盐病毒资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 培养基和缓冲液

改良 LB 培养基 (Modified Luria-Bertani medium, 简称 MLB): NaCl, 80.00 g; Tryptone, 10.00 g; Yeast extract, 5.00 g; KCl, 13.75 mg; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 4.00 mg; Fe (III) citrate, 2.50 mg; NaF, 0.06 mg; KBr, 0.02 g; SrCl<sub>2</sub>, 8.50 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5.50 mg; Na-silicate, 1.00 mg; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.00 mg; NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0.40 mg; 加去离子水至 1000 mL, 调节 pH 至 7.2-7.6, 固体培养基琼脂浓度为 2%, 半固体培养基的琼脂浓度为 0.65%。

SM 缓冲液 (Saline magnesium buffer): 100 mmol/L NaCl, 8 mmol/L MgSO<sub>4</sub>, 50 mmol/L Tris (pH7.5),

0.002% gelatin (W/V), 灭菌后室温保存。

### 1.2 样品采集及病毒富集

样品来自云南 5 个盐矿的土壤和卤水(图 1): 大理白族自治州洱源县乔后镇乔后盐矿; 楚雄彝族自治州禄丰县一平浪盐矿; 普洱市景谷县威远镇凤岗盐矿; 普洱市普洱县磨黑镇磨黑盐矿; 西双版纳傣族自治州勐腊县磨歇盐矿。取 2-3 g 土壤或 2-5 mL 卤水接种至 100 mL MLB 液体培养基于摇床 28 °C、120 r/min 培养 15 d 至培养基变混浊, 于 6000 × g、离心 15 min 收集上清, 0.22 μm 无菌过滤除菌即得到病毒富集液。

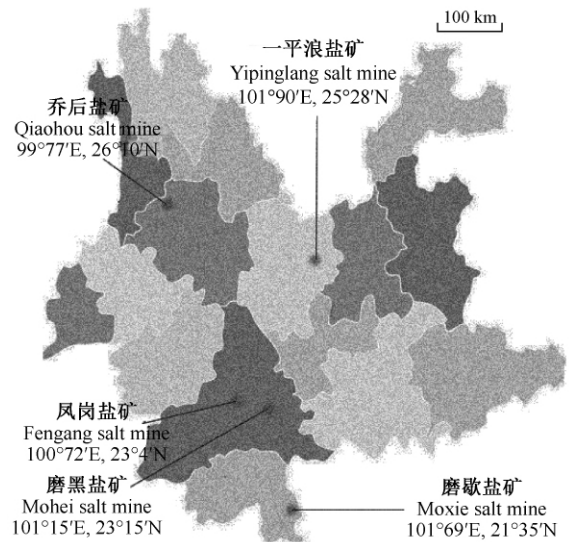


图 1. 采样点分布图

Figure 1. Location of samples.

### 1.3 富集液中病毒样颗粒电镜观察

取上述病毒富集液 37 mL, 5000 × g 离心 15 min, 去除菌体, 收集上清; 取上清液 10000 × g, 离心 15 min, 去除细胞碎片, 收集上清; 上清液于 100000 × g, 超速离心 1 h, 将沉淀重悬于 37 mL Tris-EDTA (TE) 缓冲液 (pH8.0) 中经 100000 × g, 离心 1 h; 将沉淀溶于 1 mL TE 缓冲液中再经 12000 × g, 离心 15 min 后收集上清 (2 次重复), 0.22 μm 无菌过滤, 滤液用 2% 磷钨酸钠染色 1 min, 自然晾干后置于透射电镜 (JEM-2100) 下观察其形态特征。

### 1.4 病毒的分离、纯化及形态观察

通过电镜观察筛选出存在病毒样颗粒的样品, 以本实验室前期分离获得的乔后盐矿和一平浪盐矿嗜(耐)盐菌为宿主菌分离噬菌体。噬菌体的分离纯化采用双层琼脂平板法, 取存在病毒样颗粒的样

品富集液 100  $\mu\text{L}$  与培养至对数期的嗜(耐)盐菌悬液 280  $\mu\text{L}$  于离心管中混匀,并于 28  $^{\circ}\text{C}$  静置吸附 15 min,再加入 4 mL 冷却至 45  $^{\circ}\text{C}$  左右的 MLB 半固体培养基混匀后均匀倒在 MLB 固体平板上,形成双层平板。待双层平板完全凝固后再置于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养并观察噬菌斑的形成。根据平板上所形成的噬菌斑的形态、大小等特征,用无菌牙签挑取单个噬菌体经 SM 缓冲液稀释后与相应的对数期宿主菌悬液混匀吸附,重复双层平板实验;实验连续 3 次以上,直到双层平板上所形成的噬菌斑形态大小均匀得到纯病毒为止。病毒形态观察同 1.3。

### 1.5 宿主菌 16S rRNA 基因扩增、测序与分析

采用 Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR (TaKaRa) 裂解细菌,提取基因组 DNA。16S rRNA 基因 PCR 扩增采用细菌通用引物 27F (5'-AgA gTT TgA TCC Tgg CTC Ag-3'), 1541R (5'-AAg gAg gTg ATC CAg CCg CA-3')<sup>[16]</sup>。PCR 扩增体系 (50  $\mu\text{L}$ ): 10  $\times$  Ex Taq Buffer (2.5 mmol/L), 5  $\mu\text{L}$ ; dNTP Mix (2.5 mmol/L), 4  $\mu\text{L}$ ; 27F (25 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$ ; 1541R (25 pmol/ $\mu\text{L}$ ), 1  $\mu\text{L}$ ; DNA 模板 (约 10 ng), 2  $\mu\text{L}$ ; Ex Taq (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 0.3  $\mu\text{L}$ ; 加 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu\text{L}$ 。PCR 扩增反应: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  2 min, 25 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。

扩增完成后,取 5  $\mu\text{L}$  扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增产物送至上海生工生物工程技术有限公司测序。16S rRNA 基因序列在 [www.ezbiocloud.net/eztaxon](http://www.ezbiocloud.net/eztaxon) 网站上进行在线比对。

## 2 结果和分析

### 2.1 盐矿样品中病毒样颗粒电镜观察

在云南 5 个盐矿样品中共观察到 3 种不同类型的病毒样颗粒: 头尾形病毒 (图 2); 线形病毒 (图 3); 球形病毒 (图 4)。3 类形态的病毒在 5 个盐矿中都有分布。

#### 2.1.1 头尾形病毒样颗粒 (Head-tailed viruses):

图 2 所示,从云南盐矿极端高盐环境样品富集液中观察到众多头尾形病毒样颗粒,其头部呈多面体结构。如图 2-A,该类病毒为肌尾型病毒,直径约为 55 nm,具收缩性长尾,长约 153 nm,该类病毒只在磨黑盐矿富集液中观察到;图 2-B,该类病毒为短尾型病毒,头部直径约为 55 nm,尾长约 50 nm,该类病毒只在乔后及磨歇 2 个盐矿富集液中观察到且前者较后者少;图 2-C,该类病毒为长尾型病毒,头部直径 53 - 58 nm,尾长 145 - 212 nm,长尾型病毒样颗粒在 5 个云南盐矿样品富集培养液中都极为普遍。

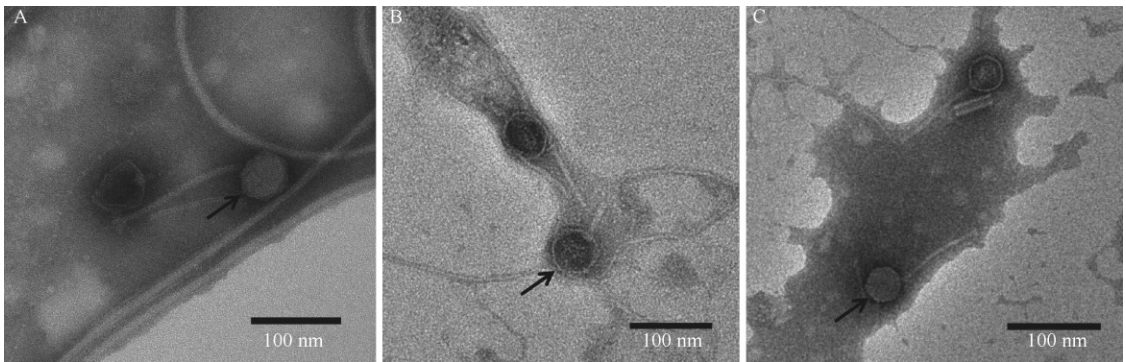


图 2. 云南盐矿中的头尾形病毒样颗粒透射电镜形态

Figure 2. Transmission electron micrographs of head-tailed viruses from salt mine in Yunnan. A: Myovirus; B: Podovirus; C: Siphovirus.

**2.1.2 线形病毒样颗粒 (Linear viruses):** 线形病毒在细菌和古菌宿主中都较为常见,其中古菌域主要是感染泉古菌中的 *Sulfolobus*、*Acidianus* 和 *Thermoproteus*。依其形态特征,将线形病毒分为 2 个科,即小杆状病毒科 (Rudiviridae) 和竿形脂毛病毒科 (Lipothrixviridae); 在细菌域中,将丝杆状病毒 (Inoviridae) 分为两个属,即丝状病毒属 (*Inovirus*) 及

杆状病毒属 (*Plectrovirus*)。从云南盐矿极端高盐环境样品富集培养液中还观察到呈杆状、线状或丝状的病毒样颗粒 (图 3)。该类病毒结构较柔韧、易弯曲、易粘连,也会断裂,其长短、粗细不一。线形病毒样颗粒在 5 个云南盐矿样品富集培养物中较为普遍,其中,凤岗盐矿、磨黑盐矿及磨歇盐矿 3 个样点中线形病毒样颗粒相对较多。

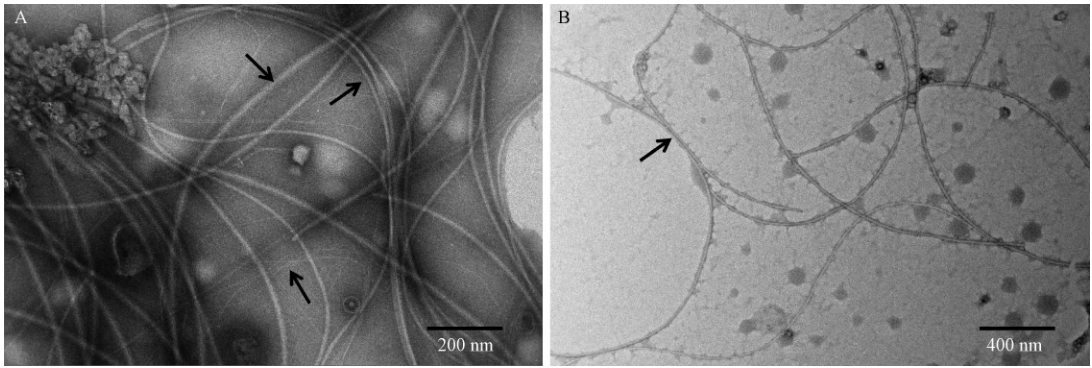


图 3. 云南盐矿中的线形病毒样颗粒的透射电镜形态

Figure 3. Transmission electron micrographs of linear viruses from salt mine in Yunnan.

### 2.1.3 球形病毒样颗粒 (Spherical viruses) :

在云南盐矿富集液中,观察到以下几种球状的病毒样颗粒,其中一种形似覆盖层病毒,直径约为 53 nm,具外壳蛋白和囊膜结构(图 4-A);另一种仅由外壳蛋白组成,直径为 43 - 73 nm,呈

堆积状态,吸附在细胞碎片上(图 4-B);其余球状病毒大小 20 - 110 nm 不等(图 4-C)。在 5 个云南盐矿样品富集培养物中都不同程度地观察到了该类型病毒,并以乔后盐矿和一平浪盐矿两个样点居多。

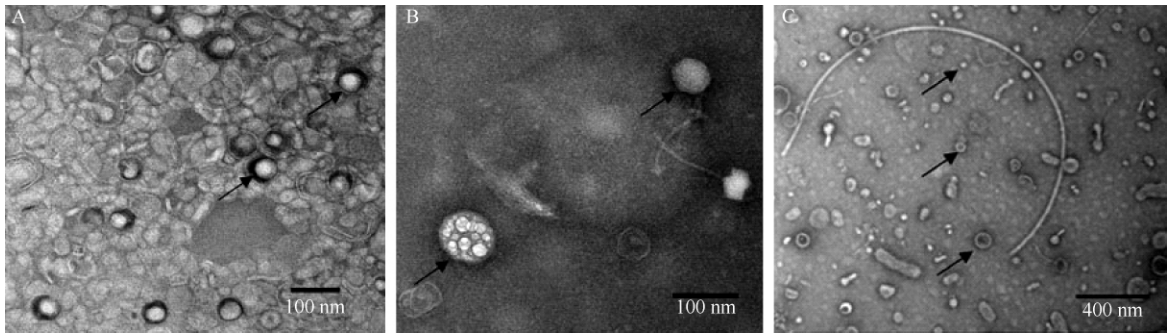


图 4. 云南盐矿中的球形病毒样颗粒透射电镜形态

Figure 4. Transmission electron micrographs of spherical viruses from salt mine in Yunnan.

## 2.2 噬菌体的分离纯化及形态特征

通过透射电镜的方法对盐矿样品进行粗筛,选择可能含有病毒样颗粒的盐矿样品,采用双层平板法分离病毒。分离获得 2 株盐单胞菌 (*Halomonas* sp.) 病毒及 1 株色盐杆菌 (*Chromohalobacter* sp.) 病毒,根据样品来源、病毒形态及宿主菌特性,将它们分别命名为 QHHSV-1 (Qiaohou *Halomonas Siphoviridae* Virus 1)、YPHSV-1 (Yipinglang *Halomonas Siphoviridae* Virus 1) 及 YPCPV-1 (Yipinglang *Chromohalobacter Pleomorphic* Virus 1)。电镜显示,QHHSV-1 和 YPHSV-1 均为长尾型病毒,该类病毒在 5 个云南盐矿样品中都观察到且数量众多;YPCPV-1 电镜形态与 HHPV-1 等多态形病毒<sup>[18]</sup>相似,这类病毒在 5 个云南盐矿样品中都未能观察到,可能是其丰度太低。

### 2.2.1 QHHSV-1、YPHSV-1 及 YPCPV-1 的噬菌斑形态:

QHHSV-1 能在 MLB 平板上形成边缘清晰、透明的噬菌斑,出斑时间约为 8 h,培养 24 h,其噬菌斑直径可达 3 mm;YPHSV-1 在平板上形成边缘清晰、透明的噬菌斑,出斑时间约为 12 h,培养 24 h,其噬菌斑直径可达 1 mm;YPCPV-1 在平板上形成边缘模糊、透光亦不易见的噬菌斑,出斑时间约为 72 h,培养 96 h,其噬菌斑直径可达 2 - 4 mm(图 5)。

### 2.2.2 QHHSV-1 的电镜形态:

经过电镜多次验证,证实 QHHSV-1 呈头尾形,头部直径约为 47 nm,尾长约为 75 nm;其尾部极易断裂(如图 6-A 及图 6-B 箭头所示)。

QHHSV-1 病毒颗粒大多不成簇而是呈单个分散,但在宿主周围往往会有大量病毒颗粒存在,并有部分病毒吸附于宿主细胞碎片表面(QHHSV-1 尾部已断裂)(图 7)。

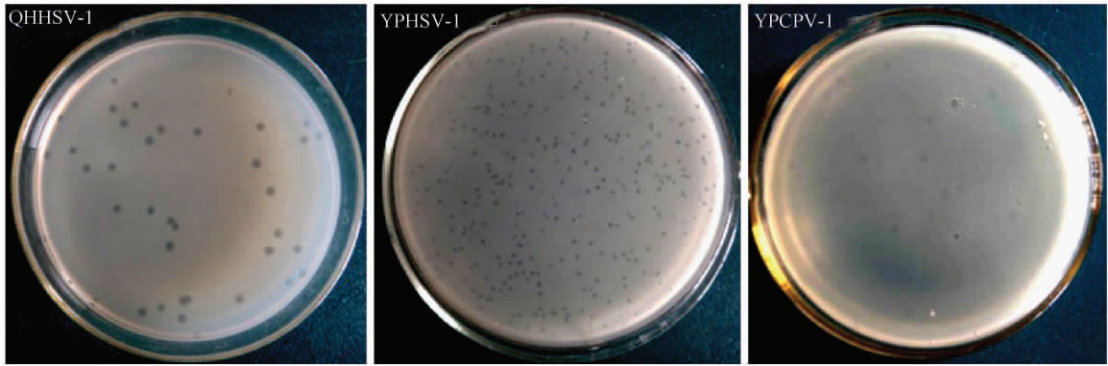


图 5. QHHSV-1、YPHSV-1 及 YPCPV-1 在 MLB 平板上的噬菌斑形态 (培养皿直径 90 mm)

Figure 5. Plaques of phages QHHSV-1, YPHSV-1 and YPCPV-1 on MLB (petri dish 90 mm in diameter).

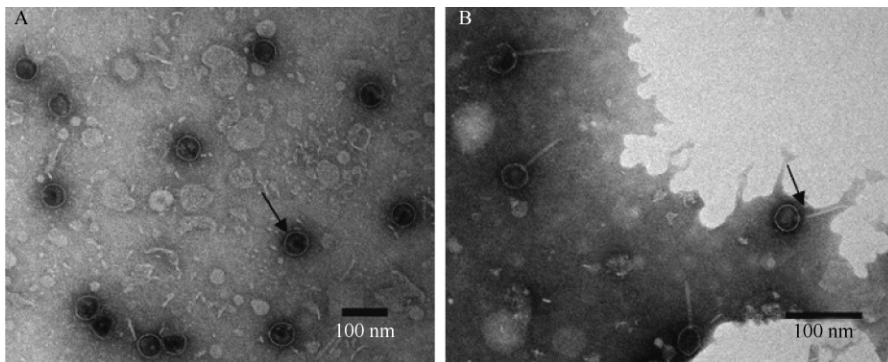


图 6. QHHSV-1 透射电镜形态

Figure 6. Transmission electron micrographs of QHHSV-1.

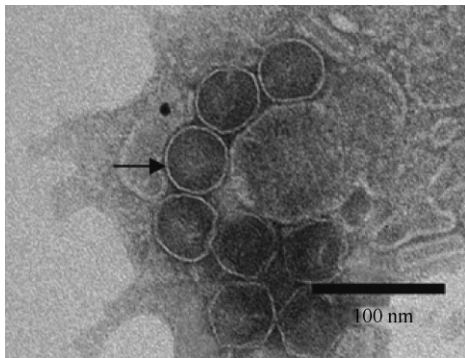


图 7. QHHSV-1 (尾部已断裂, 图中箭头所示) 及细胞碎片

Figure 7. Transmission electron micrographs of QHHSV-1 and its host cell fragments.

**2.2.3 YPHSV-1 的电镜形态:** 如图 8 所示, YPHSV-1 也呈头尾形, 头部直径约为 50 nm, 具有非收缩性长尾, 长约 140 nm。

**2.2.4 YPCPV-1 的电镜形态:** 如图 9 所示, YPCPV-1 大小 20 - 50 nm (多数颗粒大小约为 30 nm) 且表面有突起。

YPCPV-1 的电镜形态与分离自意大利、以色列、泰国、西班牙以及澳大利亚等地的高盐环境病毒 (HRPV-1、HRPV-2、HRPV-3、HRPV-6、HGPV-1、HHPV-1)<sup>[17]</sup> 形态相似。同时, YPCPV-1 与感染支原体的多态形病毒 MV-L172<sup>[18-19]</sup> 也相似, 但比 MV-L172 小很多 (图 10)。MV-L172 大小为 42 - 116 nm, 平均大小为 69 nm。

**2.2.5 宿主菌 16S rRNA 基因分析:** QHHSV-1 的宿主菌 QH52-2 的 16S rRNA 基因序列 (KP233711) 与 *Halomonas ventosae* A112<sup>T</sup> (AY268080) 的相似度达 99.6%, 将其初步鉴定为 *Halomonas ventosae*。YPHSV-1 的宿主菌 H5 的 16S rRNA 基因序列 (KP233710) 与 *Halomonas titanicae* (DQ645593) 的相似度达 98.3%, 将其初步鉴定为 *Halomonas titanicae*。YPCPV-1 的宿主菌 F7 的 16S rRNA 基因序列 (KP233709) 与 *Chromohalobacter canadensis* (AJ295143) 的相似度达 98.9%, 将其初步鉴定为 *Chromohalobacter canadensis*。



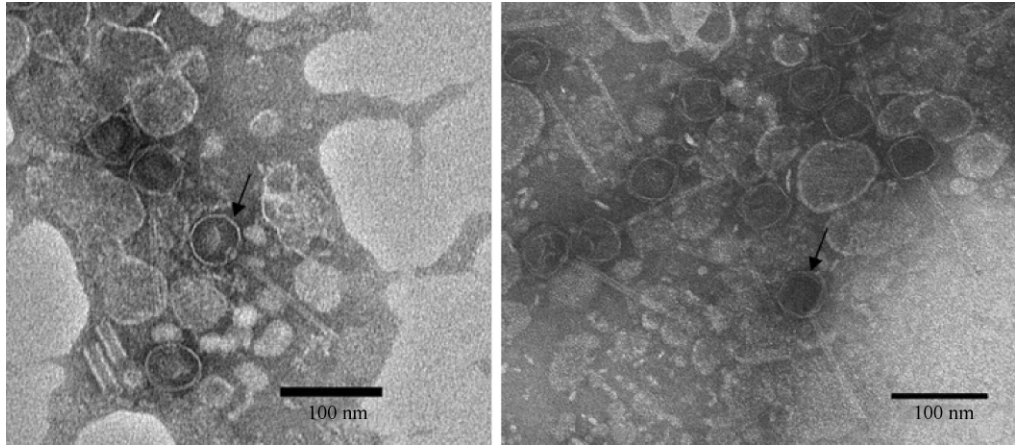


图 8. YPHSV-1 透射电镜形态

Figure 8. Transmission electron micrographs of YPHSV-1.

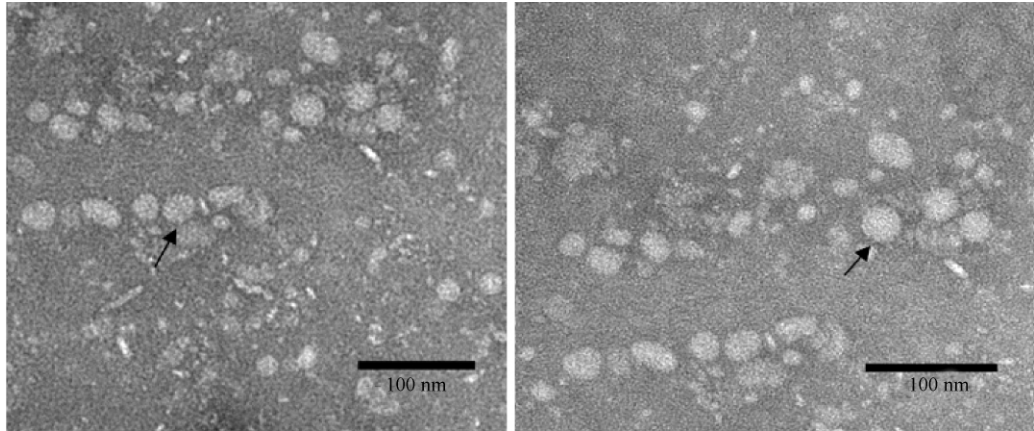


图 9. YPCPV-1 透射电镜形态

Figure 9. TEM morphology of YPCPV-1.

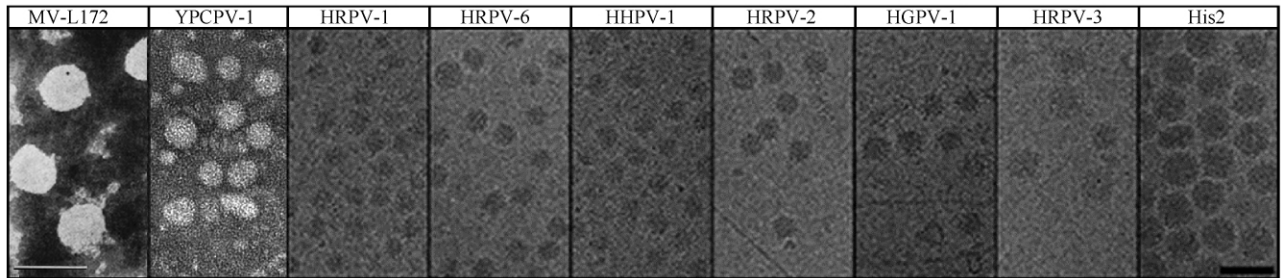


图 10. 8 株多态形病毒与 YPCPV-1 形态比较

Figure 10. Eight pleolipoviruses show similarities to YPCPV-1, Scare bar: 100 nm.

### 3 讨论

对云南 5 个盐矿采集的卤水和土壤样品进行富集培养, 超速离心浓缩收集病毒液, 并对病毒富集培养液进行电镜观察, 在 5 个盐矿中都观察到了 3 种

不同类型的病毒样颗粒: ①头尾形病毒; ②丝状病毒; ③球状病毒, 这些病毒形态与分离自意大利、以色列、泰国、西班牙以及澳大利亚等地的高盐环境病毒形态相似。本实验室前期研究表明, 云南多个盐矿原核生物具有较高的多样性<sup>[13-15]</sup>。多样的宿主为病毒多样性的存在提供了前提。我们采用双层平

板法,以本实验室前期分离获得的乔后盐矿和一平浪盐矿细菌为潜在宿主菌,以云南5个盐矿样品分离病毒,其中,从乔后盐矿、一平浪盐矿2个样点分别分离到了噬菌体QHHSV-1、YPHSV-1及YPCPV-1,这可能与我们所使用的宿主菌株是来自这两个盐矿有关。然而,令人遗憾的是,我们所能分离到的嗜盐菌病毒还很有限,不能完全反映云南盐矿中嗜盐菌病毒的多样性,未能分离纯化得到在富集样品中观察到的短尾、肌尾、球状以及丝状病毒,这可能是由我们所获得的嗜盐菌宿主资源有限以及纯培养方法自身所带来的局限性所导致的。

Atanasova等较为系统地从9个地理位置相距较远的高盐环境中分离到49株病毒(4株细菌病毒,45株古菌病毒)并进行了宿主-病毒间的相互作用分析<sup>[20]</sup>。他们所分离到的病毒中,部分与我们所分离得到的病毒形态相似,都含有头尾型及多态型两类病毒。我们所分离的QHHSV-1和YPHSV-1都属于盐单胞菌长尾型病毒,两者头部直径相差不大(分别为50 nm、47 nm),尾部长短各异(分别为75 nm、140 nm),交叉互不感染,为2株不同的嗜盐菌病毒。最近,Pietilä等提出“Pleolipoviridae(多态形病毒科)”一词来描述一类具有脂类包膜并呈现多态形的病毒。迄今为止,已报道的嗜盐菌多态形病毒有HRPV-1、HRPV-2、HRPV-3、HRPV-6、HGPV-1、HHPV-1和HHPV-2,它们均属于嗜盐古菌多态形病毒且基因组大小范围在7048-10656 bp<sup>[17, 20-23]</sup>。其中,HHPV-2由向华等人从辽宁葫芦岛晒盐场分离获得<sup>[23]</sup>。有意思的是,HHPV-2和HHPV-1的基因组结构分别为单链环状和双链环状DNA,分离地点也相距甚远,但这二株病毒的基因编码序列和排序均高度相似。除了HHPV-2外,HRPV-1和HRPV-2的基因组也为单链环状DNA,而其余3个多态形病毒则为双链环状DNA<sup>[20]</sup>。YPCPV-1的形态与Atanasova等<sup>[20]</sup>、Pietilä等<sup>[17]</sup>以及Roine等<sup>[22]</sup>所分离到的上述嗜盐古菌多态形病毒相似。同时,YPCPV-1的形态与感染支原体细胞的细菌多态形病毒MV-L172<sup>[18]</sup>也相似。

迄今为止,已报道的嗜盐菌病毒100余株,占已知的6300多种原核微生物病毒的1%-2%<sup>[12]</sup>,与高盐环境中存在的高丰度病毒相比,我们所获得的病毒还非常少,嗜盐病毒这一巨大的资源与基因宝库亟待人类的开发。同时,对这些病毒的了解也仅

局限于形态观察,仅有少数的研究达到了分子水平,包括BJ1<sup>[11]</sup>、SNJ1<sup>[10]</sup>、His1与His2<sup>[24]</sup>、φH与φCh1<sup>[25]</sup>、HF1与HF2<sup>[26-27]</sup>以及SH1<sup>[28]</sup>。Fernando等较系统地总结了高盐环境中病毒的免培养方法,如透射电镜、脉冲场凝胶电泳,原位感染率、宏基因组学以及宏转录组学等<sup>[29]</sup>,为环境病毒的研究提供了新的手段和方法。虽然目前只有极少数的嗜盐病毒被分离和培养,但研究成果仍为我们展示出诱人的前景。从盐矿这种高盐环境中分离得到的嗜盐菌病毒极其有限,如能分离到更多的盐矿嗜盐菌病毒不仅可以帮助我们了解它们在盐矿中的分布及特征,还有助于丰富我国的嗜盐病毒资源,扩展人们对病毒多样性的认识。

因此,对云南盐矿嗜盐菌病毒的研究,不仅可以帮助我们了解它们在云南盐矿中的分布及特征,还有助于丰富我国乃至全世界的嗜盐菌病毒资源,这对获得具有应用前景的新功能基因以及阐明宿主及病毒的嗜(耐)盐机制具有重要意义。进一步对嗜盐菌病毒的编码基因、蛋白质和转录模式进行相应的分析,还有助于我们了解在感染过程中复杂的宿主-病毒相互作用。

**致谢:**感谢云南大学分析测试中心卞龙春老师在电镜观察过程中的支持和帮助。

## 参考文献

- [1] Pietilä MK, Demina TA, Atanasova NS, Oksanen HM, Bamford DH. Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(6): 334-344.
- [2] Wais AC, Kon M, McDonald RE, Stollar BD. Salt-dependent bacteriophage infecting *Halobacterium cutirubrum* and *H. halobium*. *Nature*, 1975, 256(5515): 314-315.
- [3] Balter M. Evolution on life's fringes. *Science*, 2000, 289(5486): 1866.
- [4] Zhang QY. Advances in studies on biodiversity of cyanophages. *Microbiology China*, 2014, 41(3): 545-559. (in Chinese)  
张奇亚. 噬藻体生物多样性的研究动态. 微生物学通报, 2014, 41(3): 545-559.
- [5] Torsvik T, Dundas ID. Bacteriophage of *Halobacterium salinarium*. *Nature*, 1974, 248(5450): 680-681.
- [6] Pietilä MK, Demina TA, Atanasova NS, Oksanen HM, Bamford DH. Archaeal viruses and bacteriophages:

- comparisons and contrasts. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(6) : 334-44.
- [7] Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2002, 28(1) : 56-63.
- [8] Andrei AS, Banciu HL, Oren A. Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 330(1) : 1-9.
- [9] Mei YJ, Chen J, Sun DC, Chen D, Yang Y, Shen P, Chen XD. Induction and preliminary characterization of a novel halophage SNJ1 from lysogenic *Natrinema* sp. F5. *Canadian Journal of Microbiology*, 2007, 53(9) : 1106-1110.
- [10] Zhang ZQ, Liu Y, Wang S, Yang D, Cheng YC, Hu JN, Chen J, Mei YJ, Shen P, Bamford DH, Chen XD. Temperate membrane-containing halophilic archaeal virus SNJ1 has a circular dsDNA genome identical to that of plasmid pHH205. *Virology*, 2012, 434(2) : 233-241.
- [11] Pagaling E, Haigh RD, Grant WD, Cowan DA, Jones BE, Ma YH, Ventosa A, Heaphy S. Sequence analysis of an archaeal virus isolated from a hypersaline lake in Inner Mongolia, China. *BMC Genomics*, 2007, 8(1) : 410.
- [12] Ackermann HW, Prangishvili D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Archives of Virology*, 2012, 157(10) : 1843-1849.
- [13] Xiao W, Peng Q, Liu HW, Wen ML, Cui XL. Prokaryotic microbial diversity of the ancient salt deposits in the Kunming salt mine, P. R. China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(2) : 295-300. (in Chinese)  
肖炜, 彭谦, 刘宏伟, 文孟良, 崔晓龙. 昆明盐矿古老岩盐沉积中的原核生物多样性. *微生物学报*, 2007, 47(2) : 295-300.
- [14] Xiao W, Yang YL, Liu HW, Wen ML, Cui XL. Culturable bacterial diversity of the ancient salt deposits in the Kunming salt mine, P. R. China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(6) : 967-972. (in Chinese)  
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*, 2006, 46(6) : 967-972.
- [15] Chen YG, Li HM, Li QY, Chen W, Cui XL, Yang YL, Peng Q, Wen ML, Xu LH, Deng L, Wang ZG, Liu JH, Ren Z, Xiao W, Liu HW. Phylogenetic diversity of culturable bacteria in the ancient salt deposits of the Yipinglang salt mine, P. R. China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(4) : 571-577. (in Chinese)  
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, 任耗, 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*, 2007, 47(4) : 571-577.
- [16] Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 1981, 148(2) : 107-127.
- [17] Pietilä MK, Atanasova NS, Manole V, Liljeroos L, Butcher SJ, Oksanen HM, Bamford DH. Virion architecture unifies globally distributed pleolipoviruses infecting halophilic archaea. *Journal of Virology*, 2012, 86(9) : 5067-5079.
- [18] Gourlay RN, Wyld SG, Garwes DJ, Pocock DH. Comparison of mycoplasmatales virus MV-Lg-pS2-L172 with plasmavirus MV-L2 and the other mycoplasma viruses. *Archives of Virology*, 1979, 61(4) : 289-296.
- [19] Dybvig K, Nowak JA, Sladek TL, Maniloff J. Identification of an enveloped phage, mycoplasma virus L172, that contains a 14-kilobase single-stranded DNA genome. *Journal of Virology*, 1985, 53(2) : 384-390.
- [20] Atanasova NS, Roine E, Oren A, Bamford DH, Oksanen HM. Global network of specific virus-host interactions in hypersaline environments. *Environmental Microbiology*, 2012, 14(2) : 426-440.
- [21] Pietilä MK, Roine E, Paulin L, Kalkkinen N, Bamford DH. An ssDNA virus infecting archaea: a new lineage of viruses with a membrane envelope. *Molecular Microbiology*, 2009, 72(2) : 307-319.
- [22] Roine E, Kukkaro P, Paulin L, Laurinavicius S, Domanska A, Somerharju P, Bamford DH. New, closely related haloarchaeal viral elements with different nucleic acid types. *Journal of Virology*, 2010, 84(7) : 3682-3689.
- [23] Li M, Wang R, Zhao DH, Xiang H. Adaptation of the *Haloarcula hispanica* CRISPR-Cas system to a purified virus strictly requires a priming process. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(4) : 2483-2492.
- [24] Bath C, Cukalac T, Porter K, Dyal-Smith ML. His1 and His2 are distantly related, spindle-shaped haloviruses belonging to the novel virus group, *Salterprovirus*. *Virology*, 2006, 350(1) : 228-239.
- [25] Klein R, Baranyi U, Rössler N, Greineder B, Scholz H, Witte A. *Natrialba magadii* virus  $\phi$ Ch1: first complete



nucleotide sequence and functional organization of a virus infecting a haloalkaliphilic archaeon. *Molecular Microbiology*, 2002, 45 (3) : 851-863.

[26] Tang SL, Nuttall S, Ngui K, Fisher C, Lopez P, Dyal-Smith M. HF2: a double-stranded DNA tailed haloarchaeal virus with a mosaic genome. *Molecular Microbiology*, 2002, 44 (1) : 283-296.

[27] Tang SL, Nuttall S, Dyal-Smith M. Haloviruses HF1 and HF2: evidence for a recent and large recombination event. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (9) : 2810-2817.

[28] Bamford DH, Ravantti JJ, Rönholm G, Laurinavicius S, Kukkaro P, Dyal-Smith M, Somerharju P, Kalkkinen N, Bamford JKH. Constituents of SH1, a novel lipid-containing virus infecting the halophilic euryarchaeon *Haloarcula hispanica*. *Journal of Virology*, 2005, 79 (14) : 9097-9107.

[29] Santos F, Yarza P, Parro V, Meseguer I, Rosselló-Móra R, Antón J. Culture-independent approaches for studying viruses from hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (6) : 1635-1643.

## Diversity of virus-like particles from salt mines in Yunnan, China

Qin Zhao<sup>1</sup>, Pengkang Ren<sup>1,2</sup>, Yongxia Wang<sup>1</sup>, Zhiying Li<sup>1</sup>, Ming Wu<sup>3</sup>, Wei Xiao<sup>1\*</sup>, Xiaolong Cui<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan Province, China

<sup>2</sup>Experimental Education Institute of Modern Biochemistry Center, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong Province, China

<sup>3</sup>Yunnan Provincial Salt Industry Product Quality Supervision and Inspection Station, Kunming 650011, Yunnan Province, China

**Abstract:** [Objective] For exploring and characterizing the diversity of virus-like particles from salt mines in Yunnan, China. [Methods] Virus-like particles were identified from enriched brine or saline soil samples by transmission electronic microscopy and double-layer plate, and their morphological properties were further characterized. [Results] Three types of virus-like particles, head-tailed virus, linear virus and spherical virus, were observed by using transmission electronic microscopy. Then, two *Halomonas* viruses and one *Chromohalobacter* virus were subsequently isolated from Qiaohou salt mine and Yipinglang salt mine. According to the sample sources, their morphological characteristics and the character of host strains, those viruses were named as Qiaohou *Halomonas Siphoviridae* Virus 1 (QHHSV-1), Yipinglang *Halomonas Siphoviridae* Virus 1 (YPHSV-1) and Yipinglang *Chromohalobacter Pleomorphic* Virus 1 (YPCPV-1). QHHSV-1 was head-tailed virus with a diameter of 47 nm icosahedrons-like head, and an easily broken 75 nm length tail. YPHSV-1 was head-tailed virus with a diameter of 50 nm icosahedrons-like head, and a 140 nm length tail. YPCPV-1 was a pleomorphic, variable-sized (20–50 nm) virus, which possessed protuberances on the virus particles.

**Keywords:** salt mine, virus, diversity, bacteria

(本文责编:李磊,王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31200138, 31160123), by the Yunnan Provincial Sciences and Technology Department (2014FB104, 2009DA002) and by the Life Science College of Yunnan University (2013S202)

\* Corresponding author. Xiaolong Cui, Tel/Fax: + 86-871-65033543, E-mail: xlcui@ynu.edu.cn; Wei Xiao, weixiao@ynu.edu.cn

Received: 14 January 2015/Revised: 4 March 2015