

研究报告

云南黑井古盐矿可培养极端嗜盐古菌初步研究*

田新朋 张玉琴 唐蜀昆 李文均** 徐丽华 姜成林

(云南大学省微生物研究所生物资源保护与利用重点实验室 昆明 650091)

摘要: 从云南禄丰县黑井古镇古盐矿采集 30 多个盐土样品, 用 6 种极端嗜盐古菌的培养基进行分离, 共挑选出 425 株嗜盐菌。经过盐浓度耐受等实验筛选并去除可能重复菌株后共有 79 株极端嗜盐菌, 选出 15 株进行了 16S rRNA 基因序列测定, 结果显示, 其中 11 株为极端嗜盐古菌。对这 11 株菌进行初步系统发育分析发现, 它们广泛分布在极端嗜盐古菌科至少 4 个不同属中, 其中 16S rRNA 基因和已有效发表种间的序列相似性在 97 % 以上的有 6 株, 分布在 *Halorubrum*, *Natronococcus*, *Natrialba*, *Halalkalicoccus* 4 个属中; 序列相似性低于 97 % 的有 5 株: 菌株 YIM-ARC 0032, YIM-ARC 0036, YIM-ARC 0037, YIM-ARC 0050, 它们的分类地位有待进一步确定。实验初步显示出了云南黑井盐矿极端嗜盐古菌的多样性和丰富度, 值得深入研究。

关键词: 嗜盐古菌, 盐矿, 16S rRNA, 生物多样性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0001-07

**Culture-dependent Extremely Halophilic Archaea Isolated from
Heijing Ancient Salt Mine, Yunnan***

TIAN Xin-Peng ZHANG Yu-Qin TANG Shu-Kun LI Wen-Jun**

XU Li-Hua JIANG Cheng-Lin

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

Abstract: 425 halophilic bacteria strains were isolated by using six different media from thirty salt-soil samples collected from Heijing ancient salt mine, Yunnan. By the growth on NaCl gradient concentration and other screening methods, 79 strains of extremely halophilic microorganisms were chosen for further research. Based on colonies color, shape and size, 15 stains were selected to be sequenced. The sequencing results revealed that 11 of them were haloarchaea. According to the phylogenetic analysis, they belong to four genera of the family Halobacteriaceae. The blast results showed that the similarities of six sequences were higher than 97 % with the validly described species of the following four genera: *Halorubrum*, *Natronococcus*, *Natrialba*, *Halalkalicoccus*. The similarities of other five sequences with any validly described species were less than 97 %, therefore, the taxonomic positions of the following five strains YIM-ARC 0032, YIM-ARC 0036, YIM-ARC 0037, and YIM-ARC 0050 could be determined according to further polyphasic taxonomy data. The results indicated that there was a considerable diversity of haloarchaea in salt-mine environment of Heijing ancient salt mine, Yunnan and it was

* 国家“973 项目”(No. 2004CB719601)

国家自然科学基金 (No. 30270004)

云南省自然科学基金 (No. 2004 C0002Q)

新世纪优秀人才支持计划资助

** 通讯作者 Tel: 86-871-6231202, Fax: 86-871-5173878, E-mail: wjli@ynu.edu.cn, liact@hotmail.com

收稿日期: 2006-01-05, 修回日期: 2006-03-13

worth continuing to research on this area.

Key words: Extremely halophilic archaea, Salt-mine, 16S rRNA, Biodiversity

对于盐矿微生物的研究还是近几十年的事情,虽然早在 1913 年 Namyslowski^[1]就认识到盐矿卤水中存在着大量的微生物,直到 1963 年 Dombrowski^[2]和 Tasch^[3]才从古老盐矿岩盐沉积物中分离到微生物,第一次用实验证明了古老岩盐沉积的极端环境中仍然有活的生命存在的现象,从而揭开了盐矿微生物研究的新篇章。之后不少科学家对不同时期的古盐矿微生物类群进行了大量的调查,发现了大量的嗜盐耐盐细菌、真菌和极端嗜盐古菌^[4,5]。近几年来利用免培养法如 DGGE 对高盐环境极端嗜盐古菌研究,发现大量新的、更高级的类群^[6,7],但大多数有关极端嗜盐古菌高级分类单元没有得到纯培养。

随着对极端嗜盐古菌的深入研究,人们越来越清楚地认识到其研究的重要性。长期极端环境的生活与进化,所形成的独特的细胞结构、遗传特性和生理功能等^[8-10]强烈的吸引着微生物学家们的注意力。近几年来不断发现其独特性在现代分子生物学、生物电子、医学、工业生产等方面^[11]有广泛的应用前景。另外极端嗜盐古菌对研究生物进化、生命起源的意义不可估量。目前,人们对极端嗜盐古菌又赋予新的研究意义,Stan-Lotter 等^[12]从二、三叠纪 (Permo-triassic age) 古岩盐中分离到长期栖息在岩盐中才幸存下来的极端嗜盐古菌,根据陨石中也发现岩盐的报道,他们大胆推测极端嗜盐古菌极有可能是外空存在的一个很好的模式生物。

云南特殊的地质构造形成了多古盐矿集中分布的特性。规模比较大的有一平浪盐矿、磨黑、乔后、凤岗、黑井等盐矿。目前只有一平浪盐矿有有关耐盐真菌的调查^[13],对于极端嗜盐古菌的调查目前还未见报道。黑井古盐矿位于禄丰县西北部黑井镇的龙川江畔,距昆明 180km,其盐业的开采、运销始于汉,兴于唐宋,盛于明清。目前由于盐资源的开采殆尽,渐成为“失落的盐都”。

1 材料与方法

1.1 样品的采集和菌株分离

2004 年 9 月和 2005 年 3 月进行了两次样品取样,从黑井盐矿以及周边的盐洞及相关的制盐设备上共采集盐土、盐结晶和卤水等样品 35 个。采用稀释涂布平板法进行分离,37℃ 培养 2~4 周,根据菌落的大小、形态、颜色进行初步分离筛选。

1.2 分离培养基

M 1: Casamino acids 5g, Yeast extract 5g, Trisodium citrate 3g, NaCl 200g, Na₂CO₃ · 10H₂O 10g, Na-glutamate 1g, KCl 2g, MgSO₄ · 7H₂O 2g, Agar 20g, Trace salt 1mL, 蒸馏水定容至 1 L, pH 自然。

M 2: Casamino acids 7.5g, Yeast extract 10g, Trisodium citrate 3g, NaCl 250g, Na₂CO₃ · 10H₂O 8g, KCl 10g, MgSO₄ · 7H₂O 10g, Agar 20g, Trace salt 1mL, 蒸馏水定容至 1 L, pH 自然。

M 3^[14]: Casamino acids 7.5g, Yeast extract 10g, Trisodium citrate 3g, NaCl 200g, NaNO₃ 10g, KCl 2g, MgSO₄ · 7H₂O 20g, Agar 20g, Trace salt 1mL, 蒸馏水定容至 1 L, pH 7~8。

M 4^[15]: 脱脂牛奶 150 mL, (0.55×10^5 Pa, 20 min 灭菌); 无机盐溶液 (30 mL): NaCl 60g, KNO₃ 0.6g, MgSO₄ · 7H₂O 3g, 微量柠檬酸铁, (0.55×10^5 Pa, 30 min 灭菌); 琼脂溶液 (120 mL): 酪素水解物 1.5g, 甘油 3g, 琼脂 4.5g (0.55×10^5 Pa, 30 min 灭菌); 灭菌后先混合无机盐和琼脂溶液, 调 pH 至 8.0, 然后混入牛奶溶液摇匀。

M 5 (自制): NaCl 270g; K₂HPO₄ 5g; MgSO₄ · 7H₂O 10g; CaCO₃ 0.2g; 带鱼汁 20mL (含带鱼 0.46g/mL); Glucose 0.5g; Trace salt 1mL; Agar 20g; 蒸馏水 1 L, pH 7.5。带鱼汁制备: 新鲜带鱼整条约 0.5 kg, 切碎, 加水 1 L, 温火煮沸 30 min, 加终浓度 0.1 mol/L NaOH, 煮沸 30min, 1.0×10^5 Pa 高压灭菌 30 min 后细纱布过滤, 测量滤液体积并再次 1.0×10^5 Pa 高压灭菌 30 min。储备 4 °C 备用。带鱼总重量减去滤渣重量后除以滤液体积即得浓度。

M 6: Casamino acids 2g, Yeast extract 2g, Starch 2g, NaCl 160g, MgCl₂ · 6H₂O 125g, CaCl₂ · 2H₂O 0.1g, Agar 20g, Trace salt 1mL, 蒸馏水定容至 1 L, pH 6.8。

Trace salt: HCl (25 %) 10mL; FeCl₂ · 4H₂O 1.5g; ZnCl₂ 70mg; MnCl₂ · 4H₂O 100mg; H₃BO₃ 6.0mg; CoCl₂ · 6H₂O 190mg; CuCl₂ · 2H₂O 2.0mg; NiCl₂ · 6H₂O 24mg; Na₂MoO₄ · 2H₂O 36mg; 蒸馏水 990mL。pH 值调节: 使用 2 mol/L NaOH。

1.3 NaCl 和 pH 耐受试验

NaCl 和 pH 试验基础培养基均为 M 1。NaCl 耐受实验分别加入 0, 3, 5, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 22, 25, 27, 30, 33% 浓度梯度的 NaCl; pH 实验检测了 pH5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 菌的生长情况 (缓冲液参照文献 [16], 基础培养基去除 Na₂CO₃ · 10H₂O)。

1.4 细胞形态观察

细胞形态观察采用 M 1 基础培养基平板和摇瓶分别培养 3, 6, 9, 12, 15, 18d 取样观察其形态及形态变化。

1.5 生理生化测定

生理生化特征的测定主要参照 Oren 等^[17] 极端嗜盐古菌科新分类单元鉴定最低标准以及东秀珠^[18] 《常见细菌鉴定手册》中相关内容进行。主要测定了碳、氮源生长试验、明胶液化、厌氧生长、硝酸盐还原、硝酸盐产气等, 以及极端嗜盐古菌鉴定特有的部分试验。

1.6 总 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增及测序

总 DNA 的提取参照 Orsini 等^[19] 和徐平等^[20] 的方法进行。16S rRNA 基因的扩增参照王振雄等的引物: P1: 5' -ATTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3'; P2: 5' -AGGAGGT-GAT CCAGCCGCA-3'。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5min; 接着进入 94 °C 变性 1min, 52 °C 退火 1min, 72 °C 延伸 3min, 35 循环; 最后 72 °C 延伸 5min。测序由上海博亚公司协助完成。

1.7 系统进化树的构建和分析

系统进化树调集了极端嗜盐古菌科 19 个属中各自典型种的代表序列及其它相关序列作为参比对象, 以 *Methanospirillum hungatei* DSM 864^T (M60880) 作为外群, 采用 Clustal X 软件包进行了多序列比对, 应用 Mega 2.1 软件, 采用邻位相接法^[21] (Neighbor-Joining) 构建供试菌与参比菌之间的系统进化树。用于检验支持率的重复抽样次数为 1,000 次。

2 结果与分析

2.1 菌种分离

本实验通过使用几种国际上常用的极端嗜盐菌分离培养基和 1 种自行设计的培养基 (M5) 分离发现, 培养基 M 1, M 2, M 4 菌落大小、形态、颜色丰富, 培养基 M 3, M 5 和 M 6 分离效果较单一。

通过对从黑井所采集样品的多次分离共挑取纯培养 425 株, 经过盐耐受等实验筛选并去除重复菌株后共获 79 株极端嗜盐菌。选出 15 株进行了 16S rRNA 基因序列测定, 确定其中的 11 株为极端嗜盐古菌。

2.2 生理生化

选取其中的 9 株极端嗜盐古菌菌株进行了部分生理生化实验测定, 结果见表 1。其中的硝酸盐产气、以及厌氧生长为鉴定极端嗜盐古菌特有指标。从分离结果看此环境中的极端嗜盐古菌大多数为球形, 杆菌所占比例较小。

表 1 部分极端嗜盐古菌形态及生理生化

特征	菌株								
	0032	0034	0035	0036	0051	0052	0053	0054	0055
形态	球	球	球	球	球	球	球	杆	杆
大小 Φ (μm)	1.0	1.0	0.6	1.0	1.0	0.8	1.0	0.4~1.0	0.4~1.2
游动	-	-	+	-	-	-	-	-	+
二氨基庚二酸	-	-	-	-	-	-	-	-	-
淀粉水解	+	+	-	-	+	+	+	-	-
明胶水解	-	-	+	-	-	-	-	-	-
酪素水解	-	-	+	-	-	-	-	-	-
吐温 20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
吐温 80	-	-	-	-	-	-	-	+	+
吡啶产生	-	+	+	+	+	-	-	-	-
厌氧 - NaNO_3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
厌氧 - 精 AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
厌氧 - DMSO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硝酸盐还原	+	+	-	-	+	+	-	-	-
硝酸盐产气	-	+	-	-	+	-	-	-	-
H_2S 产生	-	-	+	-	+	-	-	+	+
NaCl 生长范围 (w/v%)	15~33	10~33	10~33	10~33	10~33	10~33	10~33	10~33	10~33
最适 NaCl 范围 (w/v%)	17~30	15~33	12~33	15~33	12~33	12~33	12~33	12~33	15~33
pH 生长范围	6.5~9	7~9.5	6~9	6.5~10	6.5~10	6.5~9.5	6.5~9.5	6~9	6~10
最适 pH 范围	7~8	8~9	7~8	7~9.5	7~9.5	7~9	7~9	7~8	7~8
生长温度范围 ($^{\circ}\text{C}$)	25~50	25~55	25~55	25~55	25~55	28~55	28~55	25~55	25~55
最适生长温度 ($^{\circ}\text{C}$)	30~45	30~45	30~50	30~45	30~50	35~45	35~45	30~45	30~45

注: + 表示阳性, - 表示阴性

2.2.1 生长盐浓度、pH 和温度范围: 从生长盐浓度范围和最适生长盐浓度范围可以看出极端嗜盐古菌大多数生长盐浓度在 10% 以上, 很多能在超过 30% 的盐浓度生长良好。虽然从序列初步分析结果看, 菌株 YIM-ARC 0032, YIM-ARC 0034, YIM-ARC

0051, YIM-ARC 0052, YIM-ARC 0053 均属于极端嗜盐碱菌的两个属, 但从 pH 试验结果看, 从黑井分离的菌株最适生长 pH 在 7.5 ~ 8.5, 与目前已知有效发表的典型嗜盐碱菌株最适生长 pH 8.5 ~ 9.5 有一定的差异。对于温度的耐受性, 结果显示大多数菌株生长温度在 30℃ ~ 55℃ 之间, 属中温菌。

2.2.2 碳氮源利用: 通过对 23 种唯一碳源 D-葡萄糖, 阿拉伯糖, 纤维二糖, D-核糖, 果糖, 半乳糖, 肌醇, 甘露醇, 密二糖, 棉子糖, 鼠李糖, 蔗糖, 海藻糖, 木糖醇, 木糖, 乙酸钠, 柠檬酸钠, 麦芽糖, 核糖醇, 乳糖, D-甘露糖, 山梨醇, 甜醇和 22 种唯一氮源精氨酸, 半胱氨酸, 组氨酸, 羟脯氨酸, 甲硫氨酸, 苯丙氨酸, 丝氨酸, 苏氨酸, 缬氨酸, 丙氨酸, 脯氨酸, 天门冬酰胺, 次黄嘌呤, 腺嘌呤, 酪氨酸, 赖氨酸, 甘氨酸, 谷氨酸, 对羟基苯甲酸, 胱氨酸, 色氨酸, 脲的测定发现: 这些极端嗜盐菌碳源利用范围较窄, 大多数只能应用其中的 1 ~ 2 种, 而只有菌株 YIM-ARC 0035, 对碳源的利用较广泛, 能利用其中的 14 种碳源。而氮源中只有精氨酸所有菌株都能利用; 只有菌株 YIM-ARC 0032, YIM-ARC 0035, YIM-ARC 0036, YIM-ARC 0051, YIM-ARC 0055 能利用组氨酸, 其余氨基酸均无生长现象。

2.2.3 抗生素敏感性: 通过对 25 种抗生素的敏感性试验测定发现这些盐矿极端嗜盐古菌只对 3 种抗生素敏感, 其中对痢特灵都敏感; 菌株 YIM-ARC 0032, YIM-ARC 0034, YIM-ARC 0035, YIM-ARC 0051 还对利富平敏感; 菌株 YIM-ARC 0034, YIM-ARC 0035, YIM-ARC 0036, YIM-ARC 0051 对复方新诺明敏感。对其余的抗生素包括氨苄青霉素, 头孢拉定, 菌必治, 丁胺卡那, 环丙沙星, 先锋必, 青霉素 G, 先锋 V, 头孢呋肟, 新霉素, 氟嗟酸, 红霉素, 红霉素, 先锋噻肟, 头孢噻吩, 四环素, 强力霉素, 氟哌酸, 氯霉素, 庆大霉素, 壮观霉素, 复达欣, 妥布霉素等都不敏感。

2.3 系统进化分析

系统进化分析结果显示黑井盐矿极端嗜盐古菌大致分为 4 个大的分支, 分别分属于 *Halorubrum*, *Natronococcus*, *Natrialba*, *Halalkalicoccus* 4 个属中。其中 *Natrialba*, *Halorubrum* 是两个既有中性又存在嗜碱性极端嗜盐菌的属, *Natronococcus*, *Halalkalicoccus* 属于极端嗜盐碱菌属。菌株 YIM-ARC 0054, YIM-ARC 0055 是两株杆菌都聚集在 *Halorubrum* 中, 并且与已知的菌株相似性超过 99%, 应属于已知类群。菌株 YIM-ARC0034, YIM-ARC0052, YIM-ARC0053 虽然从菌落颜色和形态上有一定差异, 但同聚集在 *Halalkalicoccus* 属中, 相似性都大于 97%, 所以具体分类地位应待进一步研究。这 3 株菌都分离自盐矿盐土, 而 *Halalkalicoccus* 属的典型种分离自新疆盐湖, 是由中国科学院北京微生物研究所的薛燕芬等^[22] 近期在国际微生物系统与进化杂志 (IJSEM) 上发表的。第 3 大类群与 *Natronococcus* 属菌株聚在一起, 但菌株 YIM-ARC0032, YIM-ARC0036, YIM-ARC0037 与典型种 *Natronococcus occultus* 相似性均低于 97%, 与同属另一株菌 *Natronococcus amylolyticus* (Ah-36) 差异更大 (< 96%)。菌株 YIM-ARC 0032, YIM-ARC 0036, YIM-ARC 0037 之间菌落形态和颜色差异较大, 而菌株 YIM-ARC 0037 与 YIM-ARC 0051 之间有一定的相似性。第 4 大类群聚集在 *Natrialba* 属中。其中菌株 YIM-ARC 0035 与典型种 *Natrialba asiatica* 相似性大于 98%, 应为已知类群。而菌株 YIM-ARC 0050 在 *Natrialba*, *Natronorubrum*, *Natrinema*, *Haloterrigena* 4 个属外形成单独分支, 无法将其归入任何已知属中, 应为属级的新分类单元 (图 1)。

研究结果表明云南黑井古镇古盐矿中极端嗜盐古菌的存在, 并分离得到了一些菌

株, 初步分类研究结果显示云南黑井古盐矿极端嗜盐古菌数量丰富, 类群多样, 并存在新种乃至新属级分类单元的古菌类群。生理生化实验结果特别是 pH 结果显示, 云南黑井古盐矿盐环境极端嗜盐古菌具有其独特性。从系统树上可以看出菌株 YIM-ARC 0032, YIM-ARC 0034, YIM-ARC 0036, YIM-ARC 0051, YIM-ARC 0052, YIM-ARC 0053 分别聚集在两个极端嗜盐碱菌属。这两个属的 3 个有效种 *N. amylolyticus* 生长 pH 范围在 8.0 ~ 10.0, *N. occultus* 生长 pH 范围在 8.5 以上; *Halalkalicoccus tibetensis* 在 8.0 以下也不能生长, 而黑井分到的这 6 株菌能够在 8.0 以下甚至 7.0 以下生长, 这种现象突破了现有极端嗜盐碱古菌生长 pH 的界限, 显示出云南黑井古盐矿独特的生境。

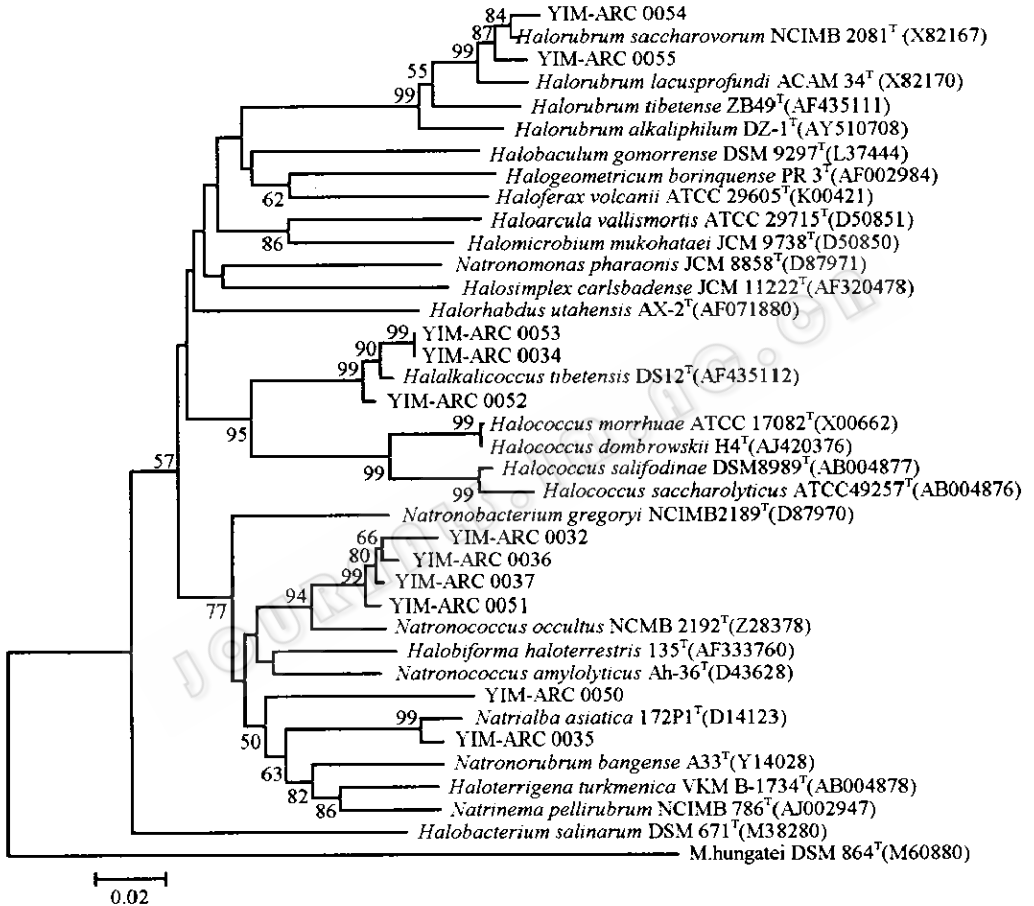


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的 11 株极端嗜盐古菌的系统进化树

根据地域和盐矿形成条件的不同, 各盐矿及盐土成分可能存在较大的差异, 虽然分离使用了国际上常用的极端嗜盐菌分离培养基, 但分离结果所反映的种类和数量仍是非常有限的。本实验仅对 15 株菌进行了 16S rRNA 基因序列的测定, 未能对所有分离到的菌株进行分类学研究, 因此所反映的物种多样性与云南黑井古盐矿极端嗜盐古菌的丰度应有一定的差距。

对于微生物资源的研究显示出, 已知微生物只占其总量的 1% ~ 10%, 即目前还有至少 90% 的微生物资源尚待开发。由于培养基中各种营养元素之间的相互影响, 所形成的理化性质都是很独特的, 都有其自身的选择性, 只是强弱程度有所不同。所以微生物物种资源的开发, 很大程度上依赖于培养基方面的重大变革。

参考文献

- [1] Namyslowski M B. Bull Acad Sci Krakow B, 1913, 3/4: 88 ~ 104.
- [2] Dombrowski H J. Ann NY Acad Sci, 1963, 108: 453 ~ 460.
- [3] Tasch P. Univ Wichita Bull, 1963, 39: 2 ~ 7.
- [4] Benlloch S, Martinez-Murcia A J, Rodriguez-Valera F. Syst Appl Microbiol, 1995, 18: 574 ~ 581.
- [5] Lizama C, Monteoliva-Sanchez M, Prado B, *et al.* Syst Appl Microbiol, 2001, 24: 464 ~ 474.
- [6] Grant W D, Kamekura M, McGenity T J, *et al.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. New York: Springer Verlag Press, 2001, 1: 294 ~ 334.
- [7] Ochsenreiter T, Pfeifer F, Schleper C. Extremophiles, 2002, 6: 267 ~ 274.
- [8] Shlomo T, Baruch P, Martin K, *et al.* J Structural Biol, 2000, 130 (1): 10 ~ 26.
- [9] 周梅先, 向 华, 谭华荣. 生物工程学报, 2002, 18 (3): 267 ~ 270.
- [10] 刘铁汉, 周培瑾. 微生物学通报, 1999, 26 (3): 232 ~ 233.
- [11] 吕爱军, 胡 斌, 温洪宇, 等. 微生物学杂志, 2005, 25 (2): 65 ~ 68.
- [12] Stan-Lotter H, Radax C, Gruber C, *et al.* Int J Astrobiol, 2002, 1 (4): 271 ~ 284.
- [13] 杨丽源, 李治莹, 李绍兰, 等. 云南大学学报, 2002, 24 (6): 465 ~ 468.
- [14] 王大力, 肖昌松, 周培瑾. 生物多样性, 1994, 2 (2): 76 ~ 81.
- [15] Sreenivasan A, Venkataraman R. J Sci and Ind Res, 1956, 15: 210 ~ 211.
- [16] 王重庆, 李云兰, 李德昌, 等. 高级生物化学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [17] Oren A, Ventosa A, Grant W D. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47: 233 ~ 238.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 330 ~ 336.
- [19] Orsini M, Romano-Spica V. Lett in Appl Microbiol, 2001, 33: 17 ~ 20.
- [20] 徐 平, 李文均, 徐丽华, 等. 微生物学通报, 2003, 30 (4): 82 ~ 84.
- [21] Saitou N, Nei M. Mol Biol Evol, 1987, 4 (4): 406 ~ 425.
- [22] Yanfen X, Huapeng F, Ventosa A, *et al.* Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55: 2501 ~ 2505.