

连云港台北和盐城三圩盐田土壤嗜盐菌 多样性研究

何敏艳 邹正中 蔡林 王革娇*

(华中农业大学农业微生物学国家重点实验室 武汉 430070)

摘要: 盐田土壤嗜盐微生物对盐田生态系统的良性循环和盐的生产至关重要。本文对江苏连云港台北盐田土壤和盐城三圩盐田土壤的嗜盐细菌和古菌的多样性进行了研究, 结果表明两地盐土嗜盐细菌和古菌的分布具有相似性和独特性。采用培养法从两地盐土中共分离到 17 株嗜盐细菌, 其中 *Halomonas* 为两地盐土共有的嗜盐细菌, 而 *Halobacillus* 和 *Pontibacillus* 仅在三圩盐土中发现。通过非培养的 16S rDNA 基因文库法从两地盐土中发现了 13 种嗜盐古菌, 台北盐土有 *Halobacterium* 和 *Haloplanus*, 三圩盐土有 *Halobacterium*, *Natronobacterium*, *Halogeometricum* 和 *Haloarcula*。10 个嗜盐古菌的 16S rDNA 和 GenBank 已知序列的同源性为 92%~97%, 可能为这些属中的新种。该研究为盐田环境嗜盐微生物资源的开发和利用奠定了基础。

关键词: 盐田土, 嗜盐细菌, 嗜盐古菌, 微生物多样性

Polymorphic Halophilic Bacteria and Haloarchaea from Lianyungang Taibei and Yancheng Sanwei Salt Field Soils

HE Min-Yan ZOU Zheng-Zhong CAI Lin WANG Ge-Jiao*

(State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: Halophilic microorganisms play important roles in salt field ecosystem and salt production. In this study, halophilic bacteria and haloarchaea from soils of Lianyungang Taibei and Yancheng Sanwei salt fields were analyzed. The halophilic bacterial and haloarchaeal types from both the soils were similar, but each soil had its distinctive species. A total of 17 halophilic bacteria were identified, among them, *Halomonas* was found from both the soils, while *Pontibacillus* and *Halobacillus* were isolated from Sanwei salt field only. Using uncultured 16S rRNA gene library technology, 13 haloarchaeal soil 16S rRNA genes were identified from both the saline soils. *Halobacterium* and *Haloplanus* were found from Taibei salt field, while *Halobacterium*, *Natronobacterium*, *Halogeometricum* and *Haloarcula* were identified from Sanwei salt field. Ten haloarchaeal 16S rRNA gene sequences showed 92%~97% identities with the GenBank sequences that appear to represent novel soil haloarchaeal species. This study provides important information that is useful for further investigation and application of halophiles of saline soil fields.

Keywords: Salt field soil, Halophilic bacteria, Haloarchaea, Microbial diversity

地球上存在着多种多样的盐域环境,有些是自然形成的,如死海和地中海等^[1];有些是人工形成的,如晒盐场、盐矿和人工腌制品等^[2]。能生存于这些盐环境中的微生物主要有耐盐细菌、嗜盐细菌、嗜盐古菌和藻类等。耐盐细菌的生长不依赖于盐浓度,而嗜盐细菌和古菌需要一定的盐浓度才生长。根据嗜盐菌生长对 NaCl 的需求将其分为 3 类:弱嗜盐菌(0.2 mol/L~0.5 mol/L)、中度嗜盐菌(0.5 mol/L~3.0 mol/L)和极端嗜盐菌(2.5 mol/L~5.2 mol/L),其中极端嗜盐菌多数为嗜盐古菌^[3]。

到目前为止从新疆、西藏、内蒙古、青海和海南等地已发现了不少嗜盐菌种属,但这些嗜盐菌大多分布于天然盐(碱)湖等^[4,5],而关于盐田环境中嗜盐菌的报道较少。我国东南部沿海地区分布着数百个盐场,为盐业的发展做出了巨大贡献,其中嗜盐微生物在盐田生态系统的良性循环和盐的生产方面扮演着重要角色。吕爱军等报道了连云港台南盐场嗜盐细菌和耐盐细菌的数量分布情况及季节变化规律^[2],但盐田环境的嗜盐细菌还没有较详细的鉴定研究。Walsh 等^[6]在加拿大一高盐土壤中鉴定出了数种嗜盐古菌。除此之外,国内外对高盐田土壤嗜盐菌多样性的报道较少,且盐田地区高盐土壤中嗜盐菌群多样性的研究也较为欠缺。

嗜盐菌在盐田中可以消耗大量的悬浮有机物,从而提高对太阳能的吸收能力和卤水的蒸发速度,进而提高原盐产量。本研究的目的是鉴定江苏省连云港和盐城两地盐田土壤中嗜盐细菌和嗜盐古菌的种群和多样性。连云港和盐城为我国重要的海盐产区,对该地区盐田土壤嗜盐菌多样性的研究在盐田生态、盐业生产和废水治理等多方面具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 样品采集与处理

盐田土样于 2006 年 3 月下旬采集于江苏连云港台北盐场和盐城三圩盐场,两采样地点相距约 30 km。每个盐场选择 10 个不同的采样点(间距约 200 m),分别取表层至 15 cm 深度的土壤,土样过 2 mm 孔径筛子后混合均匀,分两份保存,一份保存于 4 °C 用于嗜盐菌的筛选,另一份保存于 -20 °C 用于土壤总 DNA 的抽提。

1.2 土壤理化性质的测定

土壤有机质含量的测定参照于荣等方法^[7];

Na⁺、K⁺和 Mg²⁺ 离子的含量通过原子吸收分光光度计(北京普析通用仪器公司)测定;盐土 pH 值的测定方法参照^[8]。

1.3 嗜盐菌的分离与保藏

通过 HGM 培养基^[9]和 CM 培养基^[10]筛选嗜盐细菌和古菌,两地盐土各取 10 g 装入含有 90 mL 无菌生理盐水的三角瓶中,置 37 °C 摇床中振荡 30 min,进行梯度稀释后涂布平板,置 37 °C 温箱中培养 2 周。菌株经多次划线得到单菌落。经革兰氏染色后观察细胞形态和大小。

1.4 嗜盐菌耐盐性的测定

用含不同浓度 NaCl 的 HGM 培养基对嗜盐菌耐盐性及最适生长盐浓度进行测定。NaCl 浓度为 0 mol/L~5.0 mol/L,每 0.5 mol/L 一个梯度,分别接种后于 37 °C,200 r/min 培养 24 h 后用分光光度法测定细胞密度(OD_{600})。

1.5 嗜盐细菌 16S rRNA 基因的鉴定

采用菌落 PCR 的方法对分离的嗜盐细菌进行 16S rDNA 扩增。具体方法如下:用无菌牙签挑取单菌落于 50 μ L 灭菌的双蒸水中,100 °C 煮沸 5 min,冰镇 5 min,10000 r/min 离心 5 min,取上清液 2 μ L 用作 16S rDNA PCR 扩增模板。PCR 引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')^[11]。PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 1 min,49 °C 1 min,72 °C 2 min,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 *Hae*III 酶切后根据酶切产物指纹图谱去除重复菌株(即 PCR-RFLP 法),PCR 产物纯化后送交北京三博远志公司测序。

1.6 非培养法构建嗜盐古菌 16S rRNA 基因文库分析

盐土总 DNA 的抽提参照周集中的方法^[12],提取的总 DNA 经纯化后用作 PCR 扩增的模板。古菌 16S rRNA 基因的扩增引物为 A27F (5'-TCCGGT TGATCCTGCCGAG-3')和 A1540R (5'-AGGAGG TGATCCAGCCGAG-3')^[13],PCR 反应程序同上。PCR 产物纯化后与 pGEM-T 载体(Promega, USA)连接,电转化 *E. coli* DH5 α ,恢复培养后涂布含 Amp、X-Gal 和 IPTG 的 LB 平板,37 °C 培养 16 h。从两基因文库中各随机挑取约 100 个克隆,利用上述古菌引物对其 16S rDNA 进行 PCR 扩增,去重复和测序同上。

1.7 嗜盐细菌和古菌的多样性分析

嗜盐菌 16S rDNA 序列通过 Blastn 程序与 GenBank 文库中已有序列进行比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 用 ClustalW 进行同源性分析, 再用 MEGA3.1 软件 (<http://www.mega-software.net>) 构建系统发育树。

1.8 核苷酸序列注册号

可培养嗜盐细菌和非培养嗜盐古菌 16S rDNA 序列均已提交到 NCBI GenBank 文库, 其中序列注册号分别为 EF533960~EF533980 和 EF533946~EF533959。

2 结果

2.1 土壤理化性质测定

两盐土的质地、Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 离子含量、pH

值和有机质含量等有较大差别。总体上来讲两地盐含量都很高, 属高盐土。台北盐土的 Na⁺、K⁺、Mg²⁺ 离子浓度依次为三圩盐土的 2.67 倍、2.00 倍和 2.22 倍。两盐土均为弱碱性。台北盐土有机质含量为三圩盐土的 1.71 倍(表 1)。

2.2 嗜盐细菌的分离鉴定

从两地盐土中共分离到 120 株细菌, 其中大部分为耐盐细菌, 嗜盐细菌约 30 株, 利用 PCR-RFLP 去重复后共得到 17 种不同的嗜盐细菌, 其中台北盐土 4 株, 三圩盐土 13 株(图 1)。NaCl 浓度在 0.5 mol/L~4.5 mol/L 范围内能生长的菌株数依次为 1、10、3、2、1; NaCl 最适生长浓度为 0.5 mol/L、1.0 mol/L、1.5 mol/L、2.0 mol/L 的菌株数依次为 2、3、11、1(表 2)。革兰氏染色表明所有的嗜盐细菌均为阴性杆菌。嗜盐细菌 16S rDNA 的系统发育树见

表 1 台北和三圩盐场盐田土壤理化性质测定结果
Table 1 Results of physical and chemical properties of the soil of Taipei and Sanwei salt fields

土样采集地 Sampling sites	土壤质地 Texture of soil	pH	Na ⁺ (g/kg)	K ⁺ (g/kg)	Mg ²⁺ (mg/kg)	有机质含量(%) Organic carbon
台北盐场 Taipei salt field	砂土 Sandy soil	8.35	21.72	2.44	3.20	1.37
三圩盐场 Sanwei salt field	黏土 Clay	7.95	8.13	1.22	1.44	0.80

表 2 台北盐田和三圩盐田土嗜盐菌部分特征
Table 2 Partial characters of the halophiles of Taipei (L) and Sanwei (Y) saline soils

菌名 Strain	最高同源性的 GenBank 中的菌种名 The highest identity with GenBank bacterial species	序列同源性 Sequence identity (%)	NaCl 生长范围 Range of NaCl concentration (mol/L)	最适生长 NaCl 浓度 Optimum NaCl concentration (mol/L)
Y12	<i>Halomonas koreensis</i> (AY382579)	99	0.5~3.0	1.5
Y13	<i>Halobacillus trueperi</i> (DQ157162)	99	0.5~3.0	0.5
Y22	<i>Halomonas ventosae</i> (DQ316071)	99	0.5~3.0	1.5
Y23	<i>Halomonas taeanensis</i> (AY671975)	98	0.5~3.5	1.0
Y24	<i>Halobacillus</i> sp. (AY121438)	99	0.5~3.0	1.0
Y31	<i>Halomonas</i> sp. (AB305247)	99	0.5~3.0	1.5
Y32	<i>Pontibacillus</i> sp. (DQ448765)	97	0.5~3.0	1.5
Y33	<i>Halomonas variabilis</i> (AY505527)	99	0.5~3.0	1.0
Y34	<i>Pontibacillus marinus</i> (AY603977)	100	0.5~3.0	0.5
Y35	<i>Halobacillus locisalis</i> (AY190534)	99	0.5~3.5	1.5
Y38	<i>Bacillus halophilus</i> (AB021188)	99	0.5~3.5	1.5
Y71	<i>Halomonas alimentaria</i> (AF211860)	98	0.5~2.5	1.5
Y72	<i>Halomonas ventosae</i> (DQ316071)	99	0.5~3.0	1.5
L10	<i>Halomonas</i> sp. (AM229323)	99	0.5~4.0	1.5
L11	<i>Halomonas</i> sp. (AM229323)	100	0.5~4.0	1.5
L18	<i>Halomonas denitrificans</i> (AM229317)	100	0.5~4.5	1.5
L24	<i>Halomonas alkantarctica</i> (AJ564880)	99	0.5~3.0	2.0

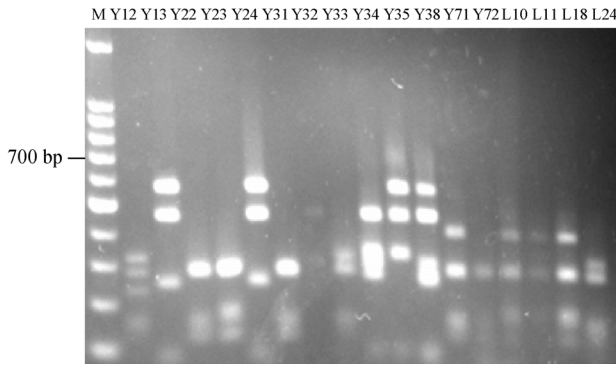


图 1 17 种嗜盐细菌的 16S rDNA-HaeIII 酶切琼脂糖凝胶电泳图(2%)

Fig. 1 An agarose gel electrophoresis (2%) showing HaeIII digested fragments of the 16S rDNAs from the 17 halophilic bacteria

M: 分子量标准
M: Molecular marker

图 2, 发育树上 17 种嗜盐细菌分属于两个不同的分支(Group I 和 Group II)。台北盐土(L)和三圩盐土(Y)中嗜盐细菌归属于 *Halomonas* (11 株), *Pontibacillus*(2 株), *Halobacillus*(4 株)等 3 个不同的属, 同源性的

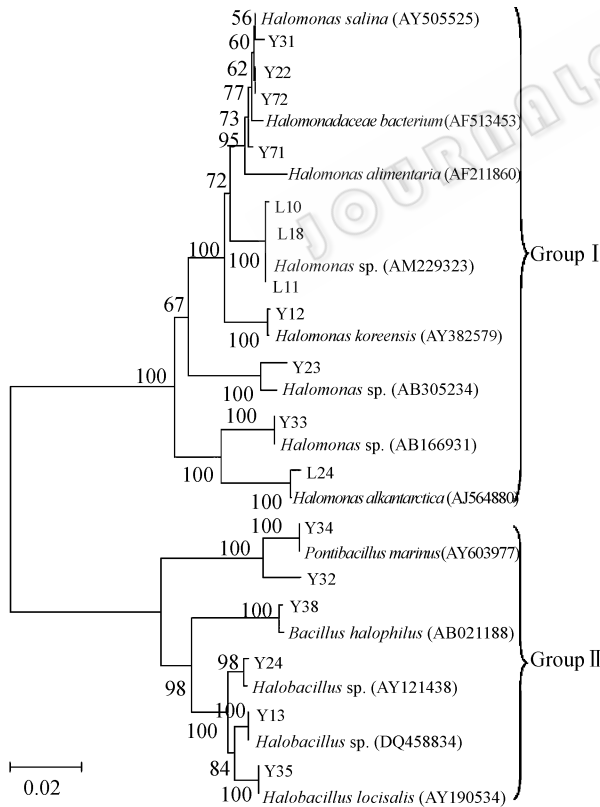


图 2 两地盐土嗜盐细菌 16S rDNA 系统发育树
Fig. 2 16S rDNA phylogenetic tree of the halophilic bacteria from Taibei (L) and Sanwei (Y) saline soils

97%~100%。*Halomonas* 为两地盐土共有的嗜盐细菌, 而 *Halobacillus* 和 *Pontibacillus* 仅在三圩盐土中发现。

2.3 嗜盐古菌的鉴定

从两地盐土中没有分离到嗜盐古菌, 故采用非培养的 16S rDNA 文库鉴定法。从台北盐土和三圩盐土中分别得到 5 种和 8 种不同的嗜盐古菌 16S rDNA 序列, 构建的系统发育树见图 3。13 个 16S rDNA 序列分布于嗜盐古菌的 *Halobacterium*、*Haloplanus*、*Natronobacterium*、*Halogeometricum* 和 *Haloarcula* 五个属, 其中 LA15、YA1、YA39 和 YA32 与 *Halobacterium saccharovororum* 具有较高的同源性, 分别为 96%、98%、99%和 98%; LA52 与 *Haloplanus natans* 同源性为 97%; YA46 与 *Haloarchaeon Nie7-1* 同源性达 97%; YA6 与 *Natronobacteriums pharaonis* 同源性仅为 92%; YA8 与 *Haloarcula marismortui* 同源性为 96%; LA9、LA11、LA54、YA9 和 YA66 与 *Halobacterium saccharovororum* 同源性分别为 94%、95%、94%、94%和 94%, 相对很低, 可能代表该属中的新种。

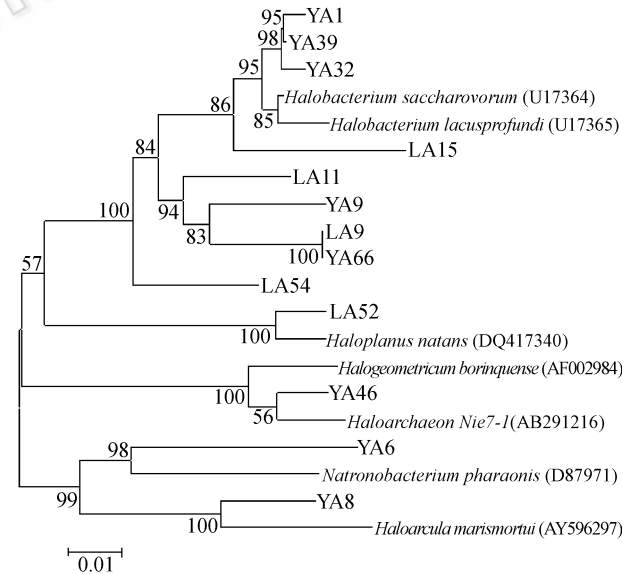


图 3 两地盐土嗜盐古菌 16S rDNA 系统发育树
Fig. 3 16S rDNA phylogenetic tree of the haloarchaeal bacteria from Taibei (L) and Sanwei (Y) saline soils

3 讨论

连云港位于东经 118°24 至 119°48, 北纬 34 至 35°07 之间, 盐城位于东经 119°27 至 120°54,

北纬 32°34 至 34°28, 两市东临黄海, 处于温带与亚热带过渡区, 全年平均气温为 14, 为湿润的季风气候。台北盐场和三圩盐场分别为两市重要的产盐区。台北盐土和三圩盐土在理化性质上存在一定的相似性和差异性, 两地盐含量都较高且呈弱碱性, 但就有机质和盐含量而言, 台北盐土明显高于三圩盐土, 两地土壤类型也不相同, 三圩盐土为黏土, 台北盐土为沙土。本研究结果表明两地的嗜盐细菌和古菌的种群分布既具有相似性和又有各自的独特性, 这可能与土壤盐含量、酸碱性、有机质含量和土壤类型等有关。

本研究分离的嗜盐细菌与吕爱军等报道的连云港台南盐田嗜盐细菌的分布相比, 盐单胞菌属(*Halomonas*)和盐芽胞杆菌属(*Halobacillus*)均有发现, 但 *Pontibacillus* 仅在本研究发现。台北盐土分离到的 4 株嗜盐细菌均属于 *Halomonas*。 *Halobacillus* 和 *Pontibacillus* 仅在三圩盐土中发现, 三圩盐土嗜盐细菌的种类和数量均多于台北盐土, 从而说明了嗜盐细菌群落结构的地理独特性。

嗜盐古菌在分类地位上属于古菌域, 是高盐生态系统的重要组成部分之一。目前对嗜盐古菌多样性研究较深入的主要是盐(碱)湖嗜盐古菌的分布, 如潘海莲等从内蒙古锡林浩特地区盐湖分离到的嗜盐古菌主要分布在 *Halorubrum*、*Natronococcus*、*Natronorubrum*、*Haloterrigena* 和 *Halorhabdus* 等属, 范华鹏等^[14]研究了从西藏扎布耶茶卡湖中分离到的 *Natronococcus*、*Natronomonas*、*Natronorubrum*、*Natrinema*、*Natronobacterium*、*Halorubrum*、*Haloterrigena* 和 *Halorhabdus* 等 8 个属嗜盐碱古菌, 相对而言, 关于盐田环境中嗜盐古菌的报道较少。本研究通过非培养的 16S rDNA 鉴定方法对台北盐土和三圩盐土嗜盐古菌进行了研究, 结果表明大部分嗜盐古菌的 16S rDNA 序列很新颖且大致分布于 5 个不同的种属: 盐碱杆菌属(*Natronobacterium*)、盐杆菌属(*Halobacterium*)、盐盘菌属(*Haloplanus*)、盐几何菌属(*Halogeometricum*)和盐盒菌属(*Haloarcula*)。 *Halobacterium* 为两地共有菌属, *Haloplanus* 仅在台北盐土中发现, *Natronobacterium*、*Halogeometricum* 和 *Haloarcula* 仅在三圩盐土中发现。Walsh 等^[6]发现嗜盐古菌种群类型随盐浓度梯度而变化, 但在本研究中台北盐土的 Na⁺、K⁺和 Mg²⁺盐度明显高于三圩盐土, 而嗜盐古菌的种类少于三圩盐土, 说明盐含量

是决定嗜盐古菌多样性的一方面, 除此之外, 酸碱度、土壤类型和有机质含量等在嗜盐古菌多样性上也起着非常重要的作用。

目前嗜盐碱古菌主要分离自盐碱湖, 嗜盐碱古菌主要分 6 类, 包括盐碱球菌属(*Natronococcus*)、盐红菌属(*Halorubrum*)、盐碱杆菌属(*Natronobacterium*)、钠白菌属(*Natrialba*)、盐碱红菌属(*Natronorubrum*) 和盐碱单胞菌属(*Natronomonas*)。本研究在三圩盐土(pH 7.95)中发现 1 株盐碱菌 YA6 (*Natronobacterium*), 而在 pH 值较高的台北盐土(pH 8.35)中却没有发现相关的种属, 说明了 pH 值不是决定嗜盐碱古菌分布的主要因素, 其种群结构受多方面因素的综合影响。

从系统发育树以及 16S rRNA 基因序列同源性来看, 13 个嗜盐古菌除 3 株与 *Halobacterium Saccharovororum* 有 98%~99%的同源性外, 其它 10 个与 GenBank 上已发表的 16S rRNA 基因序列相似性均在 92%~97%之间, 可能代表新种。

本文着重研究了台北盐土和三圩盐土嗜盐细菌和古菌的多样性, 结果表明两地盐土嗜盐菌有相似性和独特性。近年来嗜盐菌引起人们的极大兴趣, 它在工农业生产及治理环境污染方面发挥着积极的作用, 对盐田土壤嗜盐菌分布及多样性的研究为开发利用该类资源奠定了基础。





参 考 文 献

- [1] Paterek JR, Smith PH. Isolation and characterization of a halophilic methanogen from Great Salt Lake. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, **50**(4): 877-881.
- [2] 吕爱军, 王秀琴, 温洪宇, 等. 连云港台南盐田中嗜盐和耐盐菌群分布的调查. *淮北煤炭师范学院学报*, 2004, **25**(1): 47-49.
- [3] Vreeland RH. Mechanisms of halotolerance on microorganisms. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, 1987, **14**(4): 311-356.
- [4] 崔恒林, 杨 勇, 迪丽拜尔·托乎提, 等. 新疆两盐湖可培养嗜盐古菌多样性研究. *微生物学报*, 2006, **46**(2): 171-176.
- [5] 潘海莲, 周 成, 王红蕾, 等. 内蒙古锡林浩特地区嗜盐 alkaliphilic 古菌多样性的研究. *微生物学报*, 2006, **46**(1): 1-6.
- [6] Walsh DA, Papke RT, Doolittle WF. Archaeal diversity

- along a soil salinity gradient prone to disturbance. *Environmental Microbiology*, 2005, 7(10): 1655–1666.
- [7] 于 荣, 许明岗, 王伯仁. 土壤活性有机质测定方法的比较. *土壤肥料*, 2005, 2: 49–52.
- [8] 李 强, 赵秀兰, 胡彩荣. ISO10390: 2005 土壤质量 pH 的测定. *污染防治技术*, 2006, 1: 53–55.
- [9] Fairley DJ, Boyd DR, Sharma ND, *et al.* Aerobic metabolism of 4-hydroxybenzoic acid in archaea via an unusual pathway involving an intramolecular migration. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(12): 6246–6255.
- [10] Gochbauer MB, Kushner DJ. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria. *Can J Microbiol*, 1969, 15: 1157–1165.
- [11] Wilson KH, Blitchington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 1990, 28: 1942–1946.
- [12] Zhou JZ, Bruns MA, Tiedje JM. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316–322.
- [13] 许学伟, 吴 敏, 迪丽拜尔·托乎提, 等. 新疆艾比湖和伊吾湖可培养嗜盐古菌多样性. *生物多样性*, 2006, 14(4): 359–362.
- [14] 范华鹏, 薛燕芬, 曾 艳, 等. 西藏扎布耶茶卡盐碱湖古菌多样性的非培养技术分析. *微生物学报*, 2003, 43(4): 401–408.

编辑部公告

2008 年中科院微生物所期刊联合编辑部联合征订全面启动!

	<p>《微生物学报》月刊(每月 4 日出版), 单价 55.00 元, 全年定价 660 元。刊号: ISSN 0001-6209; CODEN WSHPA8。国内邮发代号: 2-504; 国外邮发代号: BM67。</p>
	<p>《生物工程学报》月刊(每月 25 日出版), 单价 65.00 元, 全年定价 780 元。刊号: ISSN 1000-3061; CODEN SGXUED。国内邮发代号: 82-13; 国外邮发代号: BM5608。</p>
	<p>《微生物学通报》月刊(每月 20 日出版), 单价 48.00 元, 全年定价 576 元。刊号: ISSN 0253-2654; CODEN WSWPDI。国内邮发代号: 2-817; 国外邮发代号: BM413。</p>
	<p>《菌物学报》双月刊(单月 15 日出版), 单价 80 元, 全年定价 480 元。刊号: ISSN 1672-6472/Q; CODEN JXUUAЕ。国内邮发代号: 2-499; 国外邮发代号: Q723。</p>
<p>订阅</p>	<p>欢迎广大读者直接与本刊发行部联系订购, 我们将按期免费为您邮寄。 汇款地址: (100101)北京市朝阳区大屯路中科院微生物所 B401 收信人: 《 》编辑部; 电话: (010)64807521; E-mail: hanl@im.ac.cn 请在附言处注明“订刊费”及所订期刊名称、年代、卷、期和数量</p>