

# 可可西里碱性土壤样品细菌的分离和生物学特性

孙莹<sup>1</sup> 苏进进<sup>1</sup> 李潮流<sup>2</sup> 康士昌<sup>2</sup> 魏玉珍<sup>1</sup> 李秋萍<sup>1</sup> 张玉琴<sup>1\*</sup> 余利岩<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院医药生物技术研究所 北京 100050)

(2. 中国科学院青藏高原研究所 北京 100085)

**摘要:** 可可西里是位于青海玉树藏族自治州的自然环境保护区, 由于当地的恶劣气候特点, 其土壤微生物多样性很少被研究。采用 5 种分离培养基对来源于可可西里的 12 个盐碱土壤样品进行选择分离, 共分离得到 5 株细菌。其中 4 株菌分别属于游动微菌属(*Planomicrobium*)、库克菌属(*Kocuria*)、气球菌属(*Aerococcus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*); 另有一株乳黄色的嗜碱耐盐细菌 CICC 100153, 其 16S rRNA 基因序列比对结果显示与最相近的地杆菌属(*Geomicrobium*)相似性仅为 93.5%。综合分析 CICC 100153 菌株的形态学、生理生化、化学分类特征、遗传与发育学特征等表型和基因型数据, 该菌既与芽孢杆菌科内的相近分类单元的嗜碱菌有很多相似之处, 也具有明显区别之处, 可能为一个潜在的新属。

**关键词:** 细菌, 碱性土壤, 16S rRNA, 可可西里

## Isolation and biological characterization of the bacteria from the alkaline soil of Hoh Xil

SUN Ying<sup>1</sup> SU Jin-Jin<sup>1</sup> LI Chao-Liu<sup>2</sup> KANG Shi-Chang<sup>2</sup> WEI Yu-Zhen<sup>1</sup>  
LI Qiu-Ping<sup>1</sup> ZHANG Yu-Qin<sup>1\*</sup> YU Li-Yan<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

(2. Institute of Tibetan Plateau Research, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

**Abstract:** Hoh Xil, an extremophile environment situated at the Yushu Tibetan Autonomous Region in southwest Qinghai, is one of the most primitive and well-preserved natural environment on earth. The microbial diversity in this area is poorly known till date. In this present study an attempt has been made to selectively isolate the alkalophilic microorganisms in 12 salina soil samples from Hoh Xil, by using five different medium. As a result, 5 alkaliphilic or salkaline tolerant isolates were obtained. 16S rRNA gene sequence analysis showed that 4 strains belonged to 4 different genera, such as *Planomicrobium*, *Kocuria*, *Aerococcus*, and *Bacillus*. Another strain, designated CICC 100153 was the nearest to the

基金项目: 科技基础条件平台项目(No. 2005DKA21203); 国家新药创制项目(No. 2009ZX09301-003, 2009ZX09302-004)

\* 通讯作者: Tel: 86-10-63187118; 信箱: 张玉琴: zhyuqin@126.com; 余利岩: yuliyang\_2000@yahoo.com

收稿日期: 2011-04-12; 接受日期: 2011-06-01

genus *Geomicrobium*, showing the 16S rRNA gene sequence similarity level of 93.5 % to the strain *Geomicrobium halophilum* BH1<sup>T</sup>. Based on the phenotypic characteristics, physiological and biochemical tests, chemotaxonomic analysis and genotypic data, we found that the strain CPCC 100153<sup>T</sup> not only shared some common characteristics with the alkaliphilic or salkaline tolerant species of the related genus in the family *Bacillaceae* but also clearly differentiated from them. Therefore, we propose the strain CPCC 100153<sup>T</sup> represents a novel genus and species within the family *Bacillaceae*.

**Keywords:** Bacteria, Alkaline soil, 16S rRNA gene, Hoh Xil

极端环境微生物是最适合生活在极端环境中的微生物的总称, 它们由于长期的进化选择, 形成了独特的生物活性物质代谢途径、新的调控机制及与这些生理生化特征有关的新基因类型<sup>[1-4]</sup>。探索和培养极端环境微生物将会为微生物药物研究和发酵工业等领域提供新的资源。

极端环境微生物可以产生工业用酶和生理活性物质, 嗜碱菌在发酵工业上可作为许多种酶制剂的生产菌, 例如嗜碱芽孢杆菌生产的木聚糖酶能够水解木聚糖产生木糖和寡聚糖, 可用来处理人造纤维废物, 而碱性  $\beta$ -甘露聚糖酶降解甘露聚糖产生的寡糖可作为保健品的添加剂<sup>[5]</sup>。

嗜碱菌生活在高碱环境中, 但研究发现其胞内 pH 值却维持在 8 左右。近年来关于嗜碱菌嗜碱机制的研究报道有许多, 研究结果表明嗜碱菌的自动调节细胞质 pH 值的机制为: (1) 嗜碱菌的细胞壁具有酸性化合物, 如半乳糖醛酸、葡糖酸、谷氨酸、磷酸, 这些化合物所带的负电荷可在细胞表面降低 pH 值。(2) 质膜可能通过反向载体(Antiporter)系统, 如  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 、 $\text{K}^+/\text{H}^+$  反向载体系统来维持胞内 pH 值的相对稳定。嗜碱菌分为兼性嗜碱菌和专

性嗜碱菌<sup>[6-7]</sup>。近来已分离鉴定 16 种芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.) 的嗜碱微生物, 包括兼性嗜碱菌和专性嗜碱菌<sup>[8-14]</sup>。

可可西里气候严酷, 自然条件恶劣, 人类无法长期居住, 其土壤中微生物多样性很少得到研究<sup>[15]</sup>, 为了探索极端环境样品中微生物的生物特性, 本研究采用 5 种分离培养基对采自青藏高原可可西里的 12 个盐碱土壤样品进行了选择性分离, 共分离得到了 5 株细菌, 其中 4 株菌株分别属于游动微菌属 (*Planomicrobium*)、库克菌属 (*Kocuria*)、气球菌属 (*Aerococcus*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*); 另外一株菌 CPCC 100153 的 16S rRNA 基因序列比对结果显示其与最相近的地杆菌属 (*Geomicrobium*) 相似性仅为 93.5%, 为进一步了解嗜碱菌的特性, 本研究围绕生物学特性对其展开了一系列研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土壤样品:** 土壤样品采自青藏高原的可可西里盐碱湖附近, 海拔约 4 700 m, 土壤样品的具体信息如表 1 所示。

表 1 土壤样品信息  
Table 1 Information of the soil samples

土壤样品号 Numbers	样品经纬度 Longitude and latitude	pH	土壤样品号 Numbers	样品经纬度 Longitude and latitude	pH
IMB08-207	N30°39.40' E90°49.33'	8.8	IMB08-213	N 30°506' E90°14'	8.69
IMB08-208	N 30°34.53' E90°37.89	9.37	IMB08-214	N 30°46.74' E90°17.89'	9.4
IMB08-210	N 30°22.55' E90°28.42'	9.39	IMB08-216	N 30°48.54' E90°19.39'	9.43
IMB08-211	N 30°31.1' E90°23.66'	9.45	IMB08-217	N30°55.60' E90°58.30'	9.46
IMB08-212	N 30°.47' E90°.20227'	8.59	IMB08-218	N 30°49.80' E91°03.84'	8.53

**1.1.2 培养基:** 分离嗜碱细菌的培养基通常用 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  或者用  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  调节 pH 值<sup>[16]</sup>。本研究针对可可西里盐碱土壤, 采用富含无机盐培养基, 并用 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  调节培养基 pH 值, 所用分离培养基为以下 5 种培养基:

(1) Bennette<sup>[17]</sup>培养基(g/L, pH 9.5): 酵母提取物 1.00, 牛肉提取物 1.00, NZ Amine Type A\* 2.00, 葡萄糖 10.00,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10.00, 氨曲南 0.05, 放线菌酮 0.05, 萘啶酮酸 0.05, 制霉菌素 0.05, 琼脂 15.00。

(2) 干酪素-淀粉培养基(g/L, pH 9.5): 干酪素 1.00,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5.00,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.50, 可溶性淀粉 10.00,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10.00, 氨曲南 0.05, 放线菌酮 0.05, 萘啶酮酸 0.05, 制霉菌素 0.05, 琼脂 15.00。

(3) Yeast extract 培养基(g/L, pH 9.5): 1%脱脂牛奶, 0.1% Yeast extract, 5% NaCl,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10.00, 氨曲南 0.05, 放线菌酮 0.05, 萘啶酮酸 0.05, 制霉菌素 0.05, 琼脂 15.00。

(4) 复合维生素培养基(g/L, pH 9.5):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  22.00,  $\text{NaHCO}_3$  8.00, NaCl 6.00,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.50, 1.00 mol/L  $\text{MgSO}_4$ , 微量盐 1.00 mL, 葡萄糖 2.00, 复合维生素 0.05, 氨曲南 0.05, 放线菌酮 0.05, 萘啶酮酸 0.05, 制霉菌素 0.05, 琼脂 15.00。

(5) 1/5 R<sub>2</sub>A (g/L, pH 9.5): 酵母粉 0.10, 胰蛋白胍 0.05, 蛋白胍 0.15, 葡萄糖 0.10, 淀粉 0.10,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05,  $\text{MgSO}_4$  0.005, 丙酮酸钠 0.06,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10.00, 氨曲南 0.05, 放线菌酮 0.05, 萘啶酮酸 0.05, 制霉菌素 0.05, 琼脂 15.00。

纯培养采用添加了 1%的  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的含有麦芽提取物和酵母提取物的 YMD 培养基斜面(g/L, pH 9.5): Yeast extract 4.00, Malt extract 10.00, Dextrose 4.00,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10.00, 琼脂 20.00。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** 试剂苯骈戊三酮(茚三酮)、P-茴香醛购自国药集团化学试剂有限公司, 丙酮、乙醇、浓硫酸和冰醋酸购自北京化工厂, 钼酸铵购自美国 Acros 公司, 液体汞购自贵州铜仁化工厂, API 50CH、API ZYM Vitek (BioMerieux)试剂盒购自法国生物梅里埃中国有限公司。PCR 扩增引物合成和产物测序由上海生物工程技术服务有限公司完成。

美国 MJ 公司 PTC-200 PCR 仪, Sigma 高速低温离心机, HZQ-Q 恒温摇床, SANYO 高压灭菌锅, ZEISS, Scope. A1 相差显微镜, Instrument JEM-1400 透射电镜, SHIMADAU-1700 分光光度计, Agilent 1200 高效液相色谱仪, Agilent 6890N 气相色谱仪。

## 1.2 方法

**1.2.1 土壤样品预处理:** 取 2 g 土样加入至 18 mL 无菌的 0.85% NaCl 溶液中, 28 °C 振荡 40 min, 无菌生理盐水稀释 100 倍。

**1.2.2 菌株的分离纯化与培养条件:** 采用稀释涂布平板法分离微生物。取 0.2 mL 上述土样悬液涂布分离平板。28 °C 保湿培养 4-8 周, 从分离平板上挑取单菌落接种于添加了 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的 YMD 培养基斜面, 将斜面于 28 °C 培养。用四划分线法在上述培养基平板上纯化, 挑取单菌落接种于添加了 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的 YMD 斜面做短期保藏; 同时, 用 20% 甘油作保护剂于 -80 °C 作长期保藏。生物学活性研究采用添加了 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的 TSB 液体培养基或者添加了 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的 YMD 固体培养基, 于 28 °C 培养观察。

## 1.3 菌株 CPCC 100153 的生物学特性研究

**1.3.1 形态学特征:** 形态学特征实验采用添加了 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的 YMD 培养基, 于 28 °C 培养观察。细胞形态学观察使用相差显微镜(ZEISS, Scope. A1)和透射电镜(Instrument JEM-1400)。关于 CPCC 100153 内生孢子实验采用添加了 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的 YMD 培养基, 在 70 °C、80 °C、90 °C 梯度下分别热激 30 min, 于 28 °C 培养观察, 并依据 Wirtz-Conklin 的芽孢染色方法在相差显微镜下观察<sup>[18]</sup>。运动性实验通过半液体培养基培养, 并在相差显微镜下观察。鞭毛通过鞭毛染色初步观察, 并用透射电镜拍摄确定。

**1.3.2 生理生化特征:** 生理生化特征的测定主要依据 Li 等<sup>[19]</sup>、Yuan 等<sup>[20]</sup>以及 Schlesner 等<sup>[21]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[22]</sup>中的方法。主要包括: pH, 盐浓度和温度耐受性, 唯一碳、氮源利用, 酶的产生, 氧化酶、接触酶活性, 明胶液化, 牛奶凝固和胨化, 纤维素分解, 硝酸盐还原, 产氨试验,  $\text{H}_2\text{S}$  的产生, 甲基红(M.R), V-P 测定, 脲酶, 吡啶, 淀粉水解, 抗生素抗性实验等。

(1) 生长特征实验采用添加了 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的 TSB 液体培养基作为基础培养基, 在此基础上,  $\text{NaCl}$  耐受实验[ $\text{NaCl}$  浓度设为 0、1%、2%、3%、4% 和 5%–25% (W/V, 每 5% 为一间隔), pH 9.5, 28 °C]; 生长 pH 实验[pH 范围设为 4.0–11.0, 每 0.5 为一间隔, 使用如下不同的缓冲溶液调 pH 值 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH<8.0;  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ , pH 8.0–10.0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ , pH 11.0), 28 °C]; 生长温度实验(温度梯度设为 4 °C、10 °C、20 °C、28 °C、37 °C、45 °C, pH 9.5)。

(2) 唯一碳源利用实验和利用碳源发酵产酸实验分别使用 Biolog GenIII 细菌全自动鉴定试剂条和 API 50 CH 试剂条测定, 酶学特性使用 API ZYM 获得相关指标。

(3) 唯一氮源利用实验采用下述培养基作为基础培养基(g/L): D-glucose 1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{NaCl}$  0.05,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.001,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.01,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  10, 不同氮源按 0.5% 的浓度加入。

(4) 其它生理生化实验:

氧化酶、接触酶实验, 明胶液化实验, 纤维素分解实验, 淀粉水解实验,  $\text{H}_2\text{S}$  的产生实验和硝酸盐还原实验参见《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[21]</sup>中的方法。

抗生素抗性实验: 采用添加了 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的 YMD 培养基, 用纸片法测定, 不同抗生素的量为 ( $\mu\text{g}/\text{per disc}$ ): 25、50、100, 在 28 °C 培养 3–5 d 后记录结果。

**1.3.3 化学分类学特征:** 全细胞壁氨基酸分析参照 Hasegawa 等<sup>[23]</sup>的方法。磷酸类脂的提取和鉴定依据 Minnikin 等<sup>[24]</sup>的方法。甲基萘醌(MK) 的提取参照 Collins 等<sup>[25]</sup>的方法, 用高效液相法(HPLC)分析靛型。脂肪酸的测定使用美国 MIDI 公司的 Sherolock 全自动细菌鉴定系统, 通过气相色谱按照 Kroppenstedt 等<sup>[26]</sup>的方法分析。

**1.3.4 遗传学和系统发育学特征:** 采用热变性的方法<sup>[27]</sup>测定基因组 DNA 中 G+C mol% 含量, 用 *Escherichia coli* K12 作为对照。采用 Chelex-100 法提取基因组 DNA, 以此为模板扩增 16S rRNA 基因<sup>[28]</sup>, 并使用 ABI PRISM 3730XL 自动测序仪进行测序。将菌株的全长 16S rRNA 基因序列在 GenBank 核酸

序列数据库中进行序列同源性比较, 使用 EzTaxon server<sup>[29]</sup>对最相近类群的序列进行多重序列比对分析, 并通过 MEGA version 4.0<sup>[30]</sup>软件以邻近法(Neighbor-Joining)构建系统发育树<sup>[31]</sup>, 分支聚类的稳定性用 Bootstrap<sup>[32]</sup>方法进行评价。

## 2 结果

### 2.1 菌株分离结果

通过采用 5 种分离培养基对采自青藏高原可可西里的 12 个盐碱土壤样品进行选择分离, 共分离得到了 5 株细菌。其中菌株 I10B-00255 来源于 IMB08-214 土样和 Bennette 培养基, 菌株 I10B-00256 来源于 IMB08-214 土样和干酪素-淀粉培养基, 菌株 I10B-00257 来源于 IMB08-210 土样和 Bennette 培养基, 菌株 I10B-00258 来源于 IMB08-212 土样和干酪素-淀粉培养基, CPCC100153 菌株来源于 IMB08-211 土样和 Bennette 培养基。

菌株的 16S rRNA 基因序列比对结果显示, 其中前 4 株菌株分别属于游动微菌属(*Planomicrobium*)、库克菌属(*Kocuria*)、气球菌属(*Aerococcus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)等 4 个属(表 2)。另外一株菌 CPCC 100153 的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中有效描述菌的最高相似性仅为 93.5%, 最相近的菌株是喜盐地杆菌 *Geomicrobium halophilum* BH1<sup>T</sup> (AB449106)。菌株 CPCC 100153 在中国普通微生物菌种保藏管理中心的保藏菌号为 CGMCC 1.10694。

### 2.2 菌株 CPCC100153 的生物学特性研究

**2.2.1 形态学特征:** 菌株 CPCC 100153 革兰氏染色呈阳性, 在添加了 1%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  的 YMD 培养基上菌落为不透光的浅黄色, 菌落最大直径约为 1.0 mm–1.2 mm。在相差显微镜下观察菌株 CPCC 100153 的细胞为短杆状, 多以 2–5 个细胞靠近排列, 细胞大小约为(0.8–0.9)  $\mu\text{m} \times$  (1.8–2.2)  $\mu\text{m}$ 。该菌经 70 °C 热激 30 min 处理后, 在 28 °C 生长出来的单菌落通过芽孢染色可观察到在细胞近中央处有椭圆形芽孢(图 1A)。菌株 CPCC 100153 经过 14 h

表 2 分离菌株 16S rRNA 基因信息  
Table 2 16S rRNA gene information of the isolates

Strain number	Accession number	Closest related strain	Similarity with the closest described species in GenBank (%)
I10B-00255	JF923575	<i>Planomicrobium koreense</i> WT024 <sup>T</sup> (GQ152129)	99.3
I10B-00256	JF923576	<i>Kocuria rosea</i> 2P03AA <sup>T</sup> (EU977667)	99.5
I10B-00257	JF923577	<i>Bacillus flexus</i> Z8B-72 <sup>T</sup> (HQ238692)	100.0
I10B-00258	JF923578	<i>Aerococcus viridians</i> DSD-PW4-OH13 <sup>T</sup> (HQ425688)	99.8
CPCC 100153	HQ179102	<i>Geomicrobium halophilum</i> BH1 <sup>T</sup> (AB449106)	93.5

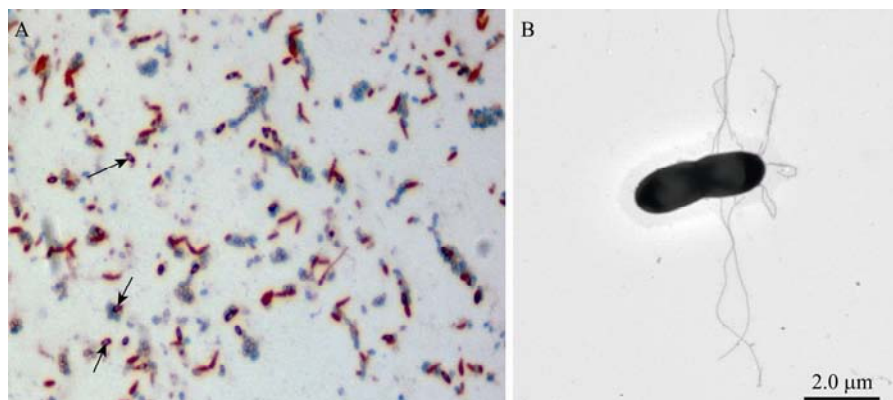


图 1 菌株 CPCC100153 的形态学照片

Fig. 1 Morphologic photos of strain CPCC 100153

注: A: 菌株 CPCC 100153 的相差显微镜照片, 显示芽孢的着生状态, 放大倍数 1 000×; B: 菌株 CPCC 100153 的透射电镜照片, 显示鞭毛的着生状态。

Note: A: Phase-contrast micrograph showing endospores of strain CPCC 100153. Magnification 1 000×. Bar: 10 μm. B: Transmission electron microscope showing flagella of strain CPCC 100153. Bar: 2.0 μm.

培养后, 可观察到运动性, 该图所示为一个即将分裂成 2 个细胞的菌体, 在透射电镜下可观察到周生多根鞭毛(图 1B)。

**2.2.2 生理生化特征:** 菌株 CPCC 100153 生长温度范围为 25 °C–37 °C, 最适生长温度为 28 °C。生长 pH 范围为 7.0–10.0, 最适生长 pH 为 8.0–9.5。NaCl 耐受范围为 0–20%, 最适生长 NaCl 浓度为 10%。

Biolog GenIII 测定结果显示: 菌株 CPCC 100153 可利用蔗糖、N-乙酰-氨基半乳糖、乳酸钠、甘油、 $\alpha$ -酮戊二酸、萘啶酸、吐温 40、 $\alpha$ -羧基-丁酸、乙酰乙酸、丙酸、乙酸、氨基曲南、丁酸钠、溴酸钠作为唯一碳源。

API 50 CH 测定菌株 CPCC 100153 可利用 D-果糖和七叶灵发酵产酸。

运用 API ZYM 酶学试剂条测得菌株 CPCC

100153 的阳性指标有: 碱磷酶、酯酶、类脂酯酶、白氨酸芳胺酶、胰凝乳蛋白酶、酸性磷酸酶、萘酚-磷酸水解酶、 $\alpha$ -葡萄糖甙酶、 $\beta$ -葡萄糖甙酶、N-乙酰-葡萄糖胺酶。

可利用甲硫氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、缬氨酸、丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、KNO<sub>3</sub>、L-天冬酰胺作为唯一氮源。

其它生理生化实验结果: 氧化酶和触酶实验阳性, 鸟氨酸脱羧酶阳性, 赖氨酸脱羧酶阳性, 精氨酸脱羧酶阴性, 明胶液化阳性, 牛奶凝固和胨化实验阴性, 纤维素分解阴性, 产氨试验阴性, 甲基红(M.R)阴性, V-P 测定阳性, 脲酶阳性, 吲哚产生实验显弱阳性, 不产生 H<sub>2</sub>S, 淀粉水解阴性, 硝酸盐还原阴性。抗生素抗性结果( $\mu$ g/per disc)如下: 对链霉素 100、抗杆菌肽 25、红霉素 25、

利福平 50、氨基青霉素 50、青霉素 G 25、万古霉素 25 敏感;对四环素 50、制霉菌素 25、新霉素 25、卡纳霉素 50、庆大霉素 50、大观霉素 25 有抗性。

以上表型特征综合显示,菌株 CPCC 100153 和芽孢杆菌科的嗜(耐)盐碱菌具有相似之处:耐盐碱中温菌,细胞革兰氏染色阳性,碳源利用谱较广。但是,比较分析发现菌株 CPCC 100153 在细胞形态、酶学特性等生物学特性方面与相关近缘菌间也存在

着明显差异(表 3)。

**2.2.3 化学分类学特征:**菌株 CPCC 100153 全细胞氨基酸水解液中含有 *meso*-DAP。细胞膜呼吸醌主要为甲基萘醌 MK-7 (94.3%),并含有少量 MK-6 (5.7%)。主要极性脂为 Diphosphatidylglycerol (DPG) 和 Phosphatidylglycerol (PG)。其菌体优势脂肪酸组分为 *iso*-C<sub>15:0</sub> (55.8%) 和 *anteiso*-C<sub>15:0</sub> (18.7%),其它脂肪酸组分为: *iso*-C<sub>17:0</sub> (8.4%), *anteiso*-C<sub>17:0</sub> (7.5%), C<sub>16:0</sub> (0.8%), *iso*-C<sub>16:0</sub> (0.8%)。

表 3 CPCC100153 和相近分类单元菌株表型特征的差异  
Table 3 Differential phenotypic characteristics of strain CPCC 100153 and the related taxa

Characteristic	1	2	3	4	5	6
Cell morphology	Short rods	Bean-shaped	Short rods	Cocci	Rod-shaped	Cocci
Spore formation	+	-	+	-	+	-
Motility	+	-	-	+	+	+
Flagella	Multiple	-	-	Multiple	ND	One or two
Salt range (W/V, %)	0-20	5-25	3-20	1-25	3-20	0-25
Optimum salt conc. (W/V, %)	10	10-15	10-12	10	10	5-15
pH range	7.5-10.0	6.0-10.0	6.8-9.5	7.5-11.0	5.8-10.0	6.0-10.0
Optimum pH	8.0-9.5	8.5-9.0	8.0	8.0-9.5	8.5	ND
Temperature range (°C)	25-37	20-40	15-40	10-45	20-50	15-37
Oxidase	+	+	+	-	-	+
Nitrate reduced to nitrite	-	-	-	-	+	+
Indole production	W	-	ND	ND	-	-
H <sub>2</sub> S production	-	-	ND	-	-	-
Acid production form:						
L-arabinose	-	-	+	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	+	+	-
D-fructose	+	-	+	-	-	-
Lactose	-	-	+	-	-	-
Maltose	-	-	+	+	-	-
D-mannitol	-	-	+	+	+	-
D-mannose	-	-	+	-	-	-
Ribose	-	-	+	-	+	-
Hydrolysis of:						
Starch	-	-	+	-	-	-
Gelatin	+	+	-	-	-	-
Urea	+	-	-	-	ND	+
Aesculin	+	-	+	-	-	-

Note: 1: Strain CPCC 100153; 2: *Geomicrobium halophilum* BH1<sup>T</sup>; 3: *Bacillus salarius* BH169<sup>T</sup>; 4: *Sinobaca qinghaiensis* YIM 70212<sup>T</sup>; 5: *Salsuginibacillus kocurii* CH9d<sup>T</sup>; 6: *Marinococcus halophilus* DSM 20408<sup>T</sup>. Data for reference strains are from the present study, Echigo *et al.* (2010)<sup>[33]</sup>, Lim *et al.* (2006)<sup>[34]</sup>, Li *et al.* (2006)<sup>[19]</sup>, Carrasco *et al.* (2007)<sup>[35]</sup> and Hao *et al.* (1984)<sup>[36]</sup>. +: Positive; -: Negative; ND: No data; W: Weak.

菌株 CPCC 100153 在胞壁氨基酸类型(含 *meso*-DAP)、优势醌组分以及主要极性脂组成上与其最相近的喜盐地杆菌 *G. halophilum* BH1<sup>T</sup> 一致; 但是菌株 CPCC 100153 的优势脂肪酸组成和喜盐地杆菌 *G. halophilum* BH1<sup>T</sup> [iso-C<sub>15:0</sub> (42%), iso-C<sub>17:0</sub> (24%), iso-C<sub>18:0</sub> (10%)]存在着较大差异。

#### 2.2.4 菌株遗传学和系统发育学特征: 菌株 CPCC

100153 基因组 DNA 的 G+C mol % 为 40 mol %。16S rRNA 基因序列(1482 nt)显示 CPCC 100153 与喜盐地杆菌 *G. halophilum* BH1<sup>T</sup> 相似性最高(93.5%)。基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树(图 2)显示菌株 CPCC 100153 在芽孢杆菌科中与菌株 *G. halophilum* BH1<sup>T</sup> 及 *Salsuginibacillus halophilus* halo-1<sup>T</sup> (EU581835)聚为一簇, 形成一个稳定的分支,

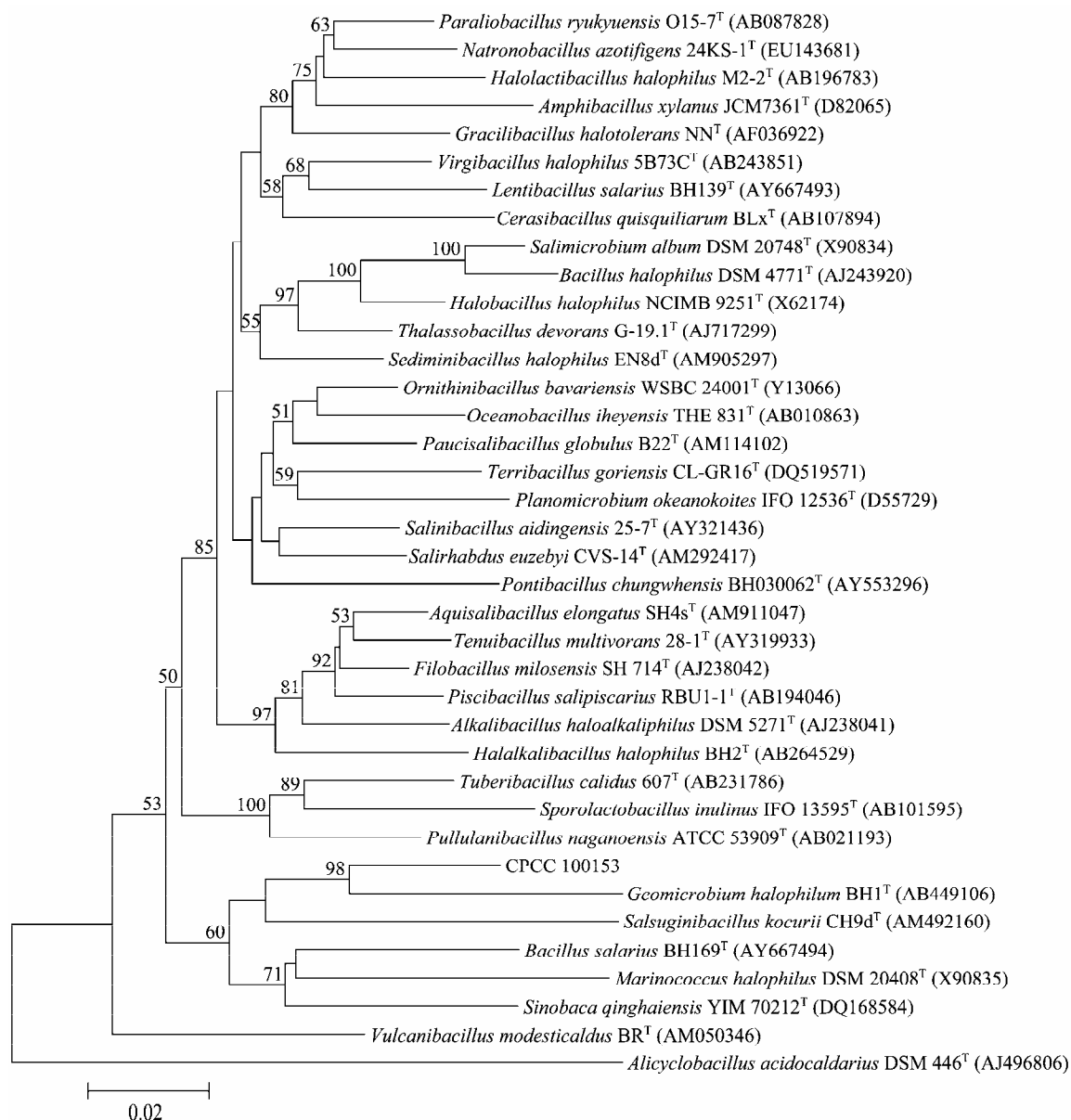


图 2 基于 16S rRNA 基因序列采用临近法构建的 CPCC 100153 和相近菌株的系统发育进化树

Fig. 2 Neighbour-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships of CPCC 100153 and other related strains

该分支与 *Bacillus salarius* DSM 16461<sup>T</sup> (AY667494)、*Marinococcus halophilus* DSM 20408<sup>T</sup> (X90835) 和 *Sinobaca qinghaiensis* DSM 17008<sup>T</sup> (DQ168584) 形成的分支临近。

系统发育分析显示, 菌株 CPCC 100153 为芽孢杆菌科的一个成员, 但是又不能归入到芽孢杆菌科的任何一个属内。结合菌株 CPCC 100153 的细胞化学组分分析以及生理生化特性, 我们认为菌株 CPCC 100153 可能代表了芽孢杆菌科的一个新属。

### 3 讨论

随着分子生态学等研究的不断深入, 人们发现自然界中只有很小部分的微生物被认知和开发, 而且从普通环境中分离筛选新的活性物质产生菌的难度也在日益上升<sup>[37]</sup>。由于极端环境中的微生物具有丰富的物种多样性、基因多样性和代谢机制多样性, 具有产生多样的生理活性物质的巨大潜力, 因而将极端环境微生物作为寻求创新药物的来源已成为众多研究者的目标之一。在我国西部的新疆、西藏、青海等地区具有大量的盐湖、碱湖, 存在着丰富的盐碱环境微生物资源, 对该环境下微生物的积极开发将有助于我们了解极端环境微生物的生理特征和代谢途径, 从而寻找到新的生理活性物质。

分离嗜碱细菌的培养基通常用 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 或者用 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 调节 pH 值。本研究针对可可西里盐碱土壤, 采用富含无机盐培养基, 并用 1% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节培养基 pH 值, 对来源于可可西里的盐碱土壤样品进行选择分离。尽管采用现有的培养基和处理方法仅分离到 5 株菌, 但通过 16S rRNA 基因序列比对发现, 其中一株细菌 CPCC 100153 的 16S rRNA 基因序列与已发表菌的最高相似度仅有 93.5%。通过与其最相近的喜盐地杆菌 *G. halophilum* BH1<sup>T</sup> 进行对比发现: 菌株 CPCC 100153 产芽孢, 周生鞭毛, 可利用果糖发酵产酸, 尿素水解阳性, 七叶灵水解阳性, 基因组 DNA 的 G+C mol% 为 40%, 菌体优势脂肪酸组分为 iso-C<sub>15:0</sub> (55.8%) 和 anteiso-C<sub>15:0</sub> (18.7%) 等特征均与喜盐地杆菌有较明显的差异。综合分析该菌株的形态学、生理生化、

化学分类特征、遗传与发育学特征等表型和基因型数据, 该菌既与芽孢杆菌科内的相近分类单元的嗜碱菌有很多相似之处, 也具有明显区别之处, 可能为一个潜在的新属。

对可可西里盐碱土样进行纯培养分离培养时, 平板上菌落较为单一且数量较少, 这可能与样品所处的极端环境有一定关系。可可西里自然条件恶劣, 微生物多样性较低, 而且生活在极端环境中的微生物有特殊的生理生化特征, 本实验中采用的培养基和处理方法具有一定的局限性, 并没有很好地分离到尽量多的嗜碱菌。鉴于目前对嗜碱微生物有效发表的种属并不多, 因此有必要参照嗜碱微生物的生理生化特征, 依据其碳源、氮源需求深入研究并设计分离培养条件和方法, 分离培养其中新的、难以培养的微生物, 并用多种模型筛选其产生的活性物质, 力求充分发掘和利用这些宝贵的微生物资源。

### 参 考 文 献

- [1] Bale SJ, Goodman K, Rochelle PA, et al. *Desulfovibrio profundus* sp. nov., a novel barophilic sulfate-reducing bacterium from deep sediment layers in the Japan Sea[J]. Int J Syst Bacteriol, 1997, 47(2): 515-521.
- [2] Chandler DP, Brockman FJ, Bailey TJ, et al. Phylogenetic diversity of Archaea and Bacteria in a deep subsurface paleosol[J]. Microb Ecol, 1998, 36(1): 37-50.
- [3] Gold T. The deep, hot biosphere[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(13): 6045-6049.
- [4] L'Haridon S, Reysenbach AL, Glénat P, et al. Hot subterranean biosphere in a continental oil reservoir[J]. Nature, 1995, 377(6546): 223-225.
- [5] Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, et al. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 2162-2169.
- [6] Krulwich TA, Guffanti AA, Bornstein RF, et al. A sodium requirement for growth, solute transport, and pH homeostasis in *Bacillus firmus* RAB[J]. J Biol Chem, 1982, 257(4): 1885-1889.
- [7] Krulwich TA, Guffanti AA. Alkaliphilic bacteria[J]. Annu Rev Microbiol, 1989, 43: 435-463.
- [8] Vedder A. *Bacillus alcalophilus* n. sp.; benevens enkele ervaringen met sterk alcalische voedingbodems[J]. An-



- tonie Leeuwenhoek J Microbiol Serol, 1934, 1: 143–147.
- [9] Spanka R, Fritze D. *Bacillus cohnii* sp. nov., a new, obligately alkaliphilic, oval-spore-forming *Bacillus* species with ornithine and aspartic acid instead of diaminopimelic acid in the cell wall[J]. Int J Syst Bacteriol, 1993, 43(1): 150–156.
- [10] Nielsen P, Fritze D, Priest FG. Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species[J]. Microbiology, 1995, 141(7): 1745–1761.
- [11] Agnew MD, Koval SF, Jarrell KF. Isolation and characterization of novel alkaliphiles from bauxite processing waste and description of *Bacillus vedderi* sp. nov., a new obligate alkaliphile[J]. Syst Appl Microbiol, 1995, 18: 221–230.
- [12] Fritze D. *Bacillus haloalkaliphilus* sp. Nov.[J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46(1): 98–101.
- [13] Switzer Blum J, Burns Bindi A, Buzzelli J, et al. *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducence*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic[J]. Arch Microbiol, 1998, 171(1): 19–30.
- [14] Yumoto I, Yamazaki K, Sawabe T, et al. *Bacillus horti* sp. nov., a new gram-negative alkaliphilic bacillus[J]. Int J Syst Bacteriol, 1998, 48: 565–571.
- [15] 郭柯. 青海可可西里地区的植被[J]. 植物生态学与地植物学学报, 1993, 17(2): 120–132.
- [16] Lee JC, Lee GS, Park DJ, et al. *Bacillus alkalitelluris* sp. nov., an alkaliphilic bacterium isolated from sandy soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(11): 2629–2634.
- [17] Jones KL. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic[J]. J Bacteriol, 1949, 57(2): 141–146.
- [18] Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, et al. Manual of Clinical Microbiology[M]. 7th ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1999.
- [19] Li WJ, Zhang YQ, Schumann P, et al. *Sinococcus qinghaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel member of the order Bacillales from a saline soil in China[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56(6): 1189–1192.
- [20] Yuan LJ, Zhang YQ, Guan Y, et al. *Saccharopolyspora antimicrobica* sp. nov., an actinomycete from soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(5): 1180–1185.
- [21] Schlesner H, Lawson PA, Collins MD, et al. *Filobacillus milensis* gen. nov., sp. nov., a new halophilic spore-forming bacterium with Orn-D-Glu-type peptidoglycan[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(Pt 2): 425–431.
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370–387.
- [23] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes[J]. J Gen Appl Microbiol, 1983, 29(4): 319–322.
- [24] Minnikin DE, O'Donnell AG, Goodfellow, et al. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids[J]. J Microbiol Methods, 1984, 2(5): 233–241.
- [25] Collins MD, Pirouz T, Goodfellow M, et al. Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria[J]. J Gen Microbiol, 1977, 100(2): 221–230.
- [26] Kämpfer P, Kroppenstedt RM. Numerical analysis of fatty acid 234 patterns of coryneform bacteria and related taxa[J]. Can J Microbiol, 1996, 42: 989–1005.
- [27] Marmur J, Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature[J]. J Mol Biol, 1962, 5(1): 109–118.
- [28] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences[J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(2): 240–245.
- [29] Chun J, Lee JH, Jung YY, et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(10): 2259–2261.
- [30] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [31] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987, 4(4): 406–425.
- [32] Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach[J]. J Mol Evol, 1981, 17(6): 368–376.
- [33] Echigo A, Minegishi H, Mizuki T, et al. *Geomicrobium halophilum* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic and alkaliphilic bacterium isolated from soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(4): 990–995.
- [34] Lim JM, Jeon CO, Lee SM, et al. *Bacillus salarius* sp. nov., a halophilic, spore-forming bacterium isolated from a salt lake in China[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56(2): 373–377.
- [35] Carrasco IJ, Márquez MC, Xue Y, et al. *Salsuginibacillus kocurii* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from soda-lake sediment[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(10): 2381–2386.
- [36] van Hao M, Kocur M, Komagata K. *Marinococcus* gen. nov., a new genus for motile cocci with meso-diaminopimelic acid in the cell wall; and *Marinococcus albus* sp. nov. and *Marinococcus halophilus* (Novitsky and Kushner) comb. nov.[J]. J Gen Appl Microbiol, 1984, 30(6): 449–459.
- [37] Courtois S, Cappellano CM, Ball M, et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(1): 49–55.