

放射污染区古菌分离及多样性分析

刘琴^{1,2} 任敏^{1,2} 张利莉^{1,2*}

(1. 塔里木大学 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 新疆 阿拉尔 843300)

(2. 塔里木大学 生命科学学院 新疆 阿拉尔 843300)

摘要:【目的】研究放射污染区古菌多样性。【方法】放射污染区采集土样,采用甘油-精氨酸培养基(GJ)、甘油-天冬氨酸培养基(C1)、海藻糖-肌酸培养基(B7)、甘露醇-丙氨酸培养基(Z5)、干酪素-甘露醇培养基(CMKA)、壳聚糖-天冬酰胺培养基(F6)、甘露醇-酸水解酪蛋白培养基(GW1)、CM培养基、HP培养基和KC培养基10种分离培养基,采用梯度稀释法对古菌进行分离,将分离获得的菌株经形态特征,16S rRNA基因片段扩增及限制性内切酶酶切,选取酶切图谱中存在差异性的条带进行测序,最终通过序列比对,聚类分析,获得不同类型的古菌资源。【结果】从该土样中共获得了256株古菌,最终筛选出71株不同类型的古菌,这71株古菌均属于广古菌门,盐杆菌纲,盐杆菌目,盐杆菌科,分布于盐陆生菌属(*Haloterrigena*)、纳白菌属(*Natrialba*)、盐球菌属(*Halococcus*)、盐红菌属(*Halorubrum*)、盐长寿菌属(*Halovivax*)、纳线菌属(*Natrinema*)、盐碱球菌属(*Natronococcus*)、盐二型菌属(*Halobiforma*)、盐嗜菌属(*Halopiger*)、盐池栖菌属(*Halostagnicola*)、富盐菌属(*Haloferax*)11个属,26个种,其中31株菌的16S rRNA基因序列与已有效发表菌株的序列相似性小于98%,*Haloterrigena*为该土样的优势菌属。对于分离效果较好的F6培养基采用了梯度营养成分的稀释,最终获得了19株古菌,这些菌株相互之间存在一定的差异性。【结论】本次分离获得了大量的古菌,表明放射污染区存在着较为丰富的古菌资源,其中蕴藏着多种新的物种类型,具有较大的研究价值。

关键词:放射污染区,嗜盐古菌,分离及多样性分析

Separation and identification of archaea from radioactive pollution

LIU Qin^{1,2} REN Min^{1,2} ZHANG Li-Li^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Production & Construction Corps, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

(2. College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

Abstract: [Objective] This study was to investigate the diversity of archaea from radioactive pollution environment. [Methods] Glycerin-arginine medium (GJ), Glycerin-aspartic acid medium (C1), Trehalose-creatine medium (B7), Mannitol-alanine medium (Z5), Casein-mannitol medium (CMKA), Chitosan-asparagine medium (F6), Mannitol-acid hydrolysis of casein medium (GW1),

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021705)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-997-4681612; ✉: zhang63lyly@sina.com

收稿日期: 2013-09-13; 接受日期: 2014-02-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-02-20

CM, HP, and KC media with different salinities were used for isolating archaea from radioactive pollution areas. Different isolates selected on the basis of morphological characteristics and *Hae* III digestion patterns of 16S rRNA genes. The results of 16S rRNA gene sequences were compared with sequences obtained from GenBank databases. Phylogenetic tree was constructed by the Neighbor-Joining method. **[Results]** Total 256 archaeal strains were obtained by different selective media, and belonged to 71 different types. They were members of *Haloterrigena*, *Natrialba*, *Halococcus*, *Halorubrum*, *Halovivax*, *Natrinema*, *Natronococcus*, *Halobiforma*, *Halostagnicola*, *Halopiger*, *Natronorubrum* and *Haloferax* genera. The similarities between detected sequences (34% of total strains) and published sequences were less than 98%. They formed distinct clades in phylogenetic tree and might represent new taxa. *Haloterrigena* was the dominant group. Nineteen strains were obtained by different Chitosan-asparagine medium (better isolating medium) ten-fold dilution culture. Compared with strains by Chitosan-asparagine medium, they were different groups. **[Conclusion]** The radioactive pollution area harbors abundant archaea, including large number of unknown bacterial groups, has a great research value.

Keywords: Area of the radioactive pollution, Archaea, Separation and identification

早期人们认为放射污染区等极端环境中没有生命体的存在,但随着科学的发展,事实证明这些环境中存在大量的微生物,并且只有在这种极端环境下这些微生物才能够正常生长繁殖^[1-2],对于极端环境微生物的研究最早开始于20世纪80年代^[3],至今有关其能够抵抗放射污染等特殊机理的研究仍在持续。

20世纪70年代后期, Woese等发现了一群序列奇异的细菌——甲烷细菌,他们认为这是地球上的第三种生命形式,命名为古细菌,即古菌。从此以后便提出了“三域学说”,即细菌域、古菌域和真核生物^[4]。古菌是目前生物地球化学研究的热点之一,它不仅能在高温、高盐度、缺氧、强酸、碱性等极端环境下存在,而且还能在普通海洋环境中存活,它在全球的生物地球化学作用中正扮演着重要角色。近年来,人们随着对古菌的不断深入研究,越来越清楚地认识到研究它的重要性。由于长期生活在极端环境中,因而形成了独特的细胞结构、遗传特性和生理功能等^[5],其独特性在现代分子生物学、医学、工业等方面有相当广泛的应用前景^[6-7],这些特性强烈地吸引着微生物学家们的注意力。另外,古菌的研究对研究生命起源、生物进化起着不可估量的作用^[8], Gerald等^[9]近年来提出对古菌进行转基因能够促进极端环境中真核生物的演化。同

时作为广泛存在于环境中的一个生物大类群,古菌还可以作为特定环境的标志物来指示该环境下的地质变迁和环境特征^[10-12]。

科研工作者针对新疆不同地区进行了相应的古菌资源的研究,如阿雅库木湖^[13]、艾比湖、伊吾湖^[14]、达坂城盐湖^[15]、罗布泊^[7]等特殊环境,且不同地域的古菌资源都存在着一定的差异性。本实验针对放射污染区土样的古菌资源采用不同的培养基进行分离及多样性研究,以期在原有科研工作者的基础上丰富古菌资源。对放射污染区的古菌进行分离鉴定及其多样性研究,对于研究该环境微生物的种类、起源及进化关系等具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 土样采集及其主要的理化性质

2010年5月从辐射污染区罗布泊地区采集土样样品,取样深度为0-60 cm,样品采集后放入无菌样品盒中,运抵实验室后分别保存在4℃和-20℃。

对样品中的可溶性总盐、氯离子、碳酸根离子、硫酸根离子、镁离子、钙离子、钾离子和钠离子8个指标进行测定,本实验由新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地综合测试中心完成(表1)。

表 1 放射污染区环境土样盐分组成

Table 1 Soil salinity composition of the radioactive contaminated area (%)

| Component | Total salt | C (Cl ⁻) | C (CO ₃ ²⁻) | C (SO ₄ ²⁻) | C (Mg ²⁺) | C (Ca ²⁺) | C (K ⁺) | C (Na ⁺) |
|-------------|------------|----------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| Soil sample | 15.06 | 3.8 | 0.003 3 | 0.41 | 0.15 | 0.39 | 0.94 | 9.35 |

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Hae* III 购自宝生物工程(大连)有限公司;用于 PCR 扩增的全套试剂均购自东盛生物科技有限公司。

PCR 仪、凝胶成像分析系统均购自美国 Bio-Rad 公司;高速冷冻离心机购自德国的 Eppendorf 公司;电泳仪购自 Biometra 公司。

1.3 分离培养基

根据土样的理化成分设计分离培养基,分别为:

(1) 甘油-精氨酸培养基(GJ, g/L): 甘油 6.00, 葡萄糖 1.20, K₂HPO₄ 0.36, MgSO₄ 6.00, Arg 0.60, 琼脂 16.00。

(2) 甘油-天冬氨酸培养基(C1, g/L): 甘油 10.0, 天冬氨酸 1.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, CaCO₃ 0.2, FeSO₄·7H₂O 0.1, 琼脂 16.0。

(3) 海藻糖-肌酸培养基(B7, g/L): 海藻糖 5.0, 肌酸 1.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, CaCO₃ 0.2, FeSO₄·7H₂O 0.1, 琼脂 16.0。

(4) 甘露醇-丙氨酸培养基(Z5, g/L): 甘露醇 10.0, Ala 1.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, CaCO₃ 0.2, FeSO₄·7H₂O 0.1, 琼脂 16.0。

(5) 干酪素-甘露醇培养基(CMKA, g/L): 酪蛋白 0.5, 甘露醇 1.8, KNO₃ 1.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, K₂HPO₄ 0.5, CaCO₃ 0.5, 琼脂 16.0。

(6) 壳聚糖-天冬酰胺培养基(F6, g/L): 壳聚糖 4.00, 酪素水解蛋白 2.00, 天冬酰胺 1.00, K₂HPO₄ 0.36, MgSO₄ 6.00, 琼脂 16.00。

(7) 甘露醇-酸水解酪蛋白培养基(GW1, g/L): 干酪素 0.30, 甘露醇 1.00, NaHCO₃ 2.00, CaCO₃ 0.20, (NH₄)₂SO₄ 2.00, KNO₃ 2.00, K₂HPO₄ 1.00, MgSO₄·7H₂O 2.00, FeSO₄ 0.01, Trace-salt 0.01, 琼脂 16.00。

(8) 完全培养基(CM, g/L): 酪素水解物 7.5,

酵母膏 10.0, 柠檬酸三钠 3.0, MgSO₄ 20.0, KCl 2.0, FeSO₄·7H₂O 0.1, 琼脂 16.0。

(9) HP 培养基(g/L): 海藻糖 1.6, Pro 1.2, (NH₄)₂SO₄ 1.2, CaCl₂ 4.0, K₂HPO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, 琼脂 16.0。

(10) KC 培养基(g/L): Ca(NO₃)₂·4H₂O 0.100, MgSO₄·7H₂O 0.250, (NH₄)₂SO₄ 0.500, MnSO₄·4H₂O 0.075, KH₂PO₄ 0.250, FeSO₄·7H₂O 0.025, 琼脂 16.000。

1.4 分离方法

将采集的土样烘干(37 °C, 5 h), 研磨成粉末状, 称取 2 g 样品, 放入 18 mL 添加玻璃珠的 15.06% 的无菌盐溶液中, 放入 37 °C 摇床 120 r/min 充分振荡 1 h, 以制成 10⁻¹ 悬浊液, 吸取 100 μL 悬浊液, 涂布于固体分离培养基上, 每种固体培养基在营养成分不变的情况下, 设置 5%、10%、15%、20%、25%、30% 6 个 NaCl 浓度梯度, 每种培养基做 3 个重复, 用保鲜膜包裹之后放入 37 °C 倒置培养 10–30 d, 最后挑取单菌落在固体 CM 培养基上纯化 3 次后保藏。

针对菌株的保藏采用两种方式:

(1) 甘油管保藏: 将液体 CM 培养基中加入 30% 的甘油, 吸取 1.2 mL 放入冻存管内, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。在无菌条件下, 挑取适量菌体放入灭菌后的冻存管内, -20 °C 保存。

(2) 冷冻干燥保藏: 先将安瓿管塞上棉塞, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min, 烘干后加入 20% 的脱脂牛奶约 0.4 mL, 1×10⁵ Pa 灭菌 10 min, 待冷却后, 挑取适量菌体于安瓿管中, -80 °C 冻存 12 h 之后真空抽干 12 h, 然后用酒精喷灯封口, 4 °C 保藏。

1.5 菌株鉴定

1.5.1 形态观察: 观察菌落的形状、颜色、透明度、是否突起、革兰氏染色, 以及显微镜观察其细胞的形状。

1.5.2 16S rRNA 基因克隆测序：将分离获得的菌株借鉴周培瑾等^[16]提取菌株 DNA 的方法，以提取的 DNA 产物为模板，通过古菌通用引物(P1 : 5'-ATTCCGTTGTACCTGCCGGA-3' ,P2 :5'-AGG AGGTGATCCAGCCGAG-3')进行相应菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增。扩增体系为 (50 μ L 体系) : ddH₂O 39 μ L ; *Taq* buffer 5 μ L ; 10 μ mol/L dNTPs 1 μ L ; 10 μ mol/L P₁ 0.8 μ L ; 10 μ mol/L P₂ 0.8 μ L ; BSA 2.2 μ L ; *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L ; DNA 1 μ L。PCR 循环反应条件为 : 95 $^{\circ}$ C 4 min ; 95 $^{\circ}$ C 1 min , 55 $^{\circ}$ C 30 s , 72 $^{\circ}$ C 2 min , 共 30 个循环。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。将 PCR 产物纯化回收并与 PMD18-T 载体连接转入感受态 DH5 α ,进行蓝白斑筛选,并对菌落进行 PCR 检测,PCR 体系为(25 μ L 体系) : ddH₂O 20.4 μ L ; 10 \times Buffer 2.5 μ L ; 10 μ mol/L dNTPs 0.5 μ L ; 10 μ mol/L M₁₃A 0.2 μ L ; 10 μ mol/L M₁₃B 0.2 μ L ; 5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.1 μ L ; 模板菌落 1 μ L。PCR 循环反应条件为 : 94 $^{\circ}$ C 4 min ; 94 $^{\circ}$ C 1 min , 56 $^{\circ}$ C 1 min , 72 $^{\circ}$ C 2 min , 共 30 个循环 ,72 $^{\circ}$ C 8 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物 ,将扩增产物送到上海生工生物工程有限公司进行测序。通过 BLAST 程序将测序结果提交到 GenBank 数据库中进行相似性比对搜索,然后将相关的属、种近缘菌株的 16S rRNA 基因序列下载下来,构建系统进化树,以此方法将本实验的菌株鉴定到种。

1.6 梯度稀释法分离菌株

将序列比对获得的菌株,进行培养基归类,最后得出 F6 培养基获得的菌株数量远远大于其他 9 种培养基,考虑到采样环境的特殊性(干燥、含盐碱量大、营养匮乏、辐射污染区),对 F6 培养基进行低营养成分实验。将 F6 培养基所有的营养成分进行 1/2、1/10 梯度营养稀释,在每一种通过营养稀释之后的培养基中加入 5%、10%、15%、20%、25%、30%的 NaCl,采用与 1.4 相同的分离方法,对菌株进行分离并保藏,然后提取菌株 DNA,扩增 16S rRNA 基因,并通过克隆测序,进行序列比

对后获得最终菌株信息,构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 放射污染区古菌的分离结果

采用 10 种不同分离培养基共分离到古菌 256 株,通过形态特征、16S rRNA 基因 *Hea* III 酶切图谱等方法剔除重复菌株后,获得具有代表性的 71 株古菌进行 16S rRNA 基因序列分析,通过 BLAST 程序与 GenBank 已知序列对比后构建系统进化树(图 1)。从图 1 中可以看出分离得到的古菌均属于广古菌门(Euryarchaeota),盐杆菌纲(Halobacteria),盐杆菌目(Halobacteriales),盐杆菌科(Halobacteriaceae),分布于盐陆生菌属(*Haloterrigena*)、纳白菌属(*Natrialba*)、盐球菌属(*Halococcus*)、盐红菌属(*Halorubrum*)、盐长寿菌属(*Halovivax*)、纳线菌属(*Natrinema*)、盐碱球菌属(*Natronococcus*)、盐二型菌属(*Halobiforma*)、盐惰菌属(*Halopiger*)、盐池栖菌属(*Halostagnicola*)、富盐菌属(*Haloferax*) 11 个属,*Hbf. lacisalsi*、*Hcc. salifodinae*、*Hfx. prahovense*、*Hpg. xanaduensis*、*Hpg. aswanensis*、*Hrr. kocurii*、*Hrr. xinjiangense*、*Hrr. lipolyticum*、*Hrr. saccharovorum*、*Hrr. aidingense*、*Hst. larsenii*、*Htg. salina*、*Htg. turkmenica*、*Htg. longa*、*Htg. saccharevitans*、*Htg. limicola*、*Htg. thermotolerans*、*Hvx. asiaticus*、*Hvx. ruber*、*Nab. aegyptia*、*Nnm. ejinorensis*、*Nnm. versiforme*、*Nnm. salaciae*、*Nnm. pallidum*、*Ncc. jeotgali* 26 个种,且大部分菌株都处于一个单独的分类单元。其中 31 株菌的 16S rRNA 基因序列与已有效发表菌株的序列相似性小于 98%,为疑似新种,其鉴定工作有待进一步完成。

研究表明 *Haloterrigena* 是放射污染区的优势菌属,占 35.21%,在 NaCl 浓度为 20%的情况下,达到了 18.31%,其中 *Htg. turkmenica* 是 *Haloterrigena* 的优势种,达到了该属菌株总数的 47.83%。*Natrinema* 和 *Halorubrum* 两个属含有的菌种数仅次于 *Haloterrigena*,但是其含有的菌株数量远远少于 *Haloterrigena* (表 2)。F6 培养基分离到的菌株数大于其它培养基分离到的菌株数(图 2),其分离出

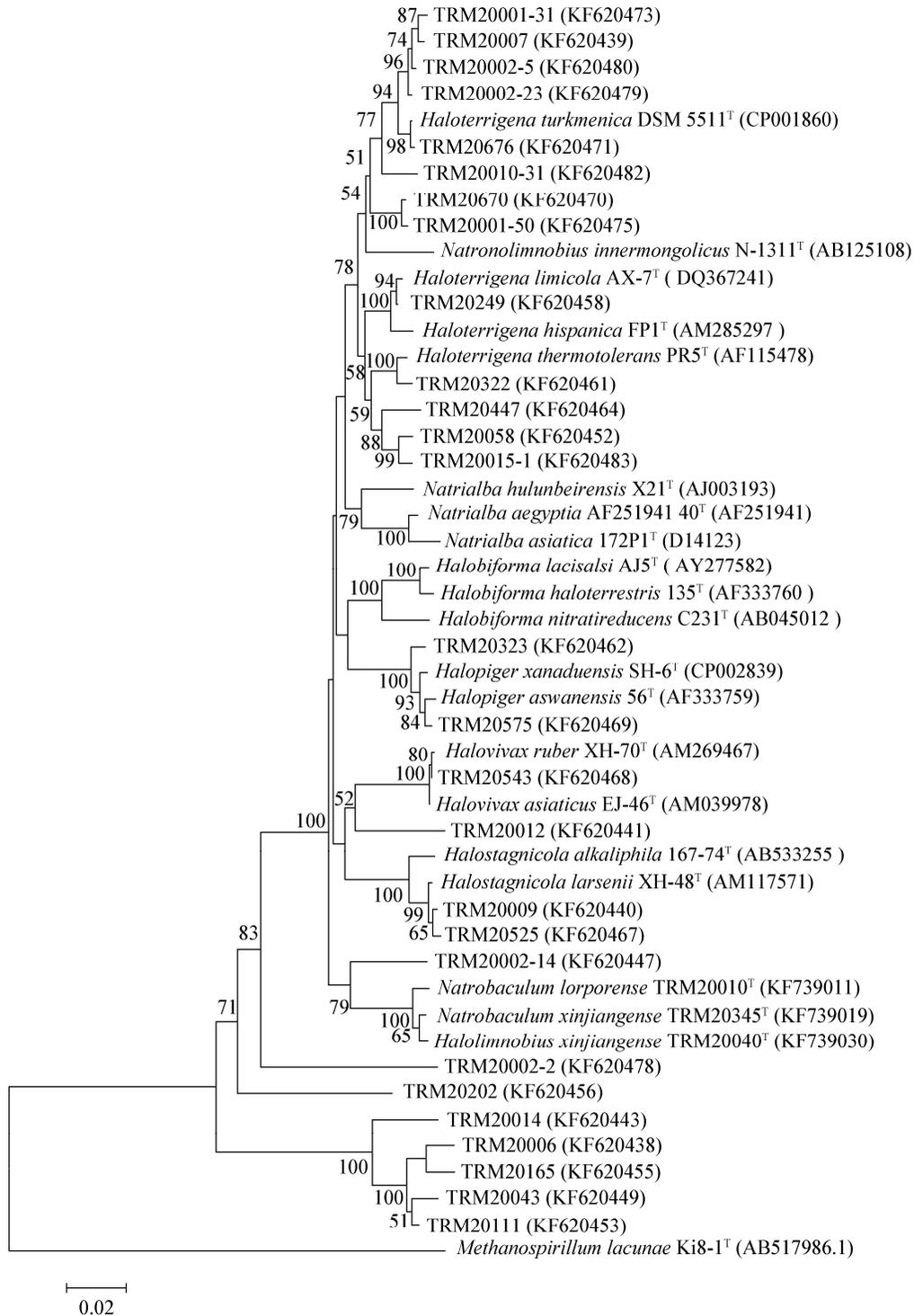


图 1 样品部分古菌与相关种构建的 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 1 Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic relationships of archaea partial sequences obtained from soil samples with their closely related sequences downloaded from GenBank

Note: The scale bar represents the estimated number of base changes per nucleotide sequence position. Sequences of clones detected in this study are indicated with "KF". The numbers in parentheses are accession numbers of sequences.

表 2 不同培养基的古菌分离结果
Table 2 Archaeas isolated from different culture medium

| 属名 Genus | 种名 Species | F6 | 序列相似性 Similarity (%) | KC | 序列相似性 Similarity (%) | CMKA | 序列相似性 Similarity (%) | HP | 序列相似性 Similarity (%) | 合计 Total |
|-----------------------|-----------------------------|----|----------------------------|----|----------------------------|------|----------------------------|----|----------------------------|-------------|
| <i>Halobiforma</i> | <i>Hbf. lacisalsi</i> | 1 | 95.39 | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 1 |
| <i>Haloferax</i> | <i>Hfx. prahovense</i> | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 1 | 99.85 | 1 |
| <i>Halopiger</i> | <i>Hpg. xanaduensis</i> | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 1 | 98.66 | 1 |
| | <i>Hpg. aswanensis</i> | 1 | 99.04 | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 1 |
| <i>Halorubrum</i> | <i>Hrr. kocurii</i> | 2 | 99.92 | 0 | — | 1 | 99.40 | 1 | 98.86 | 4 |
| | <i>Hrr. xinjiangense</i> | 0 | — | 0 | — | 2 | 99.14–99.19 | 1 | 99.48 | 3 |
| | <i>Hrr. lipolyticum</i> | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 1 |
| | <i>Hrr. saccharovorum</i> | 1 | 99.26 | 0 | — | 1 | 99.41 | 0 | — | 2 |
| | <i>Hrr. aidingense</i> | 1 | 98.33 | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 1 |
| <i>Halostagnicola</i> | <i>Hst. larsenii</i> | 0 | — | 1 | 99.55 | 0 | — | 0 | — | 2 |
| <i>Haloterrigena</i> | <i>Htg. salina</i> | 1 | 97.87 | 0 | — | 1 | 97.35 | 1 | 97.75 | 3 |
| | <i>Htg. turkmenica</i> | 3 | 96.99–99.30 | 1 | 98.68 | 0 | — | 2 | 98.11–99.54 | 11 |
| | <i>Htg. longa</i> | 0 | — | 2 | 96.25–96.44 | 1 | 96.34 | 0 | — | 3 |
| | <i>Htg. saccharevittans</i> | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 1 | 99.26 | 2 |
| | <i>Htg. limicola</i> | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 1 | 99.78 | 2 |
| | <i>Htg. thermotolerans</i> | 1 | 96.25 | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 2 |
| <i>Halovivax</i> | <i>Hvx. asiaticus</i> | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 1 | 93.67 | 1 |
| | <i>Hvx. ruber</i> | 0 | — | 0 | — | 1 | 94.43 | 0 | — | 2 |
| <i>Natrialba</i> | <i>Nab. aegyptia</i> | 0 | — | 0 | — | 2 | 93.92–94.33 | 0 | — | 3 |
| <i>Natrinema</i> | <i>Nnm. ejinorensis</i> | 0 | — | 5 | 96.18–97.05 | 0 | — | 2 | 96.24–96.5 | 8 |
| | <i>Nnm. versiforme</i> | 0 | — | 2 | 98.30 | 1 | 98.29 | 0 | — | 3 |
| | <i>Nnm. salaciae</i> | 2 | 96.69–96.80 | 0 | — | 1 | 96.73 | 0 | — | 3 |
| | <i>Nnm. pallidum</i> | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 0 | — | 1 |
| <i>Natronococcus</i> | <i>Ncc. jeotgali</i> | 1 | 99.62 | 1 | 99.54 | 0 | — | 0 | — | 2 |
| Total | | 14 | | 12 | | 11 | | 12 | | 63 |

的菌株主要分布于 *Halobiforma*、*Halopiger*、*Halorubrum* 和 *Haloterrigena* 4 个属中的 8 个分类单元，KC 培养基、HP 培养基分离到的菌株数仅次于 F6 培养基，KC 培养基中分离到的古菌分布于 *Halostagnicola*、*Haloterrigena*、*Natrinema* 和

Natronococcus 4 个属 6 个分类单元；HP 培养基分离到的古菌分布最广泛，含有 *Haloferax*、*Halopiger*、*Halorubrum*、*Haloterrigena*、*Halovivax* 和 *Natrinema* 6 个属 10 个分类单元，成为这 10 种培养基中物种资源最丰富的一种培养基。

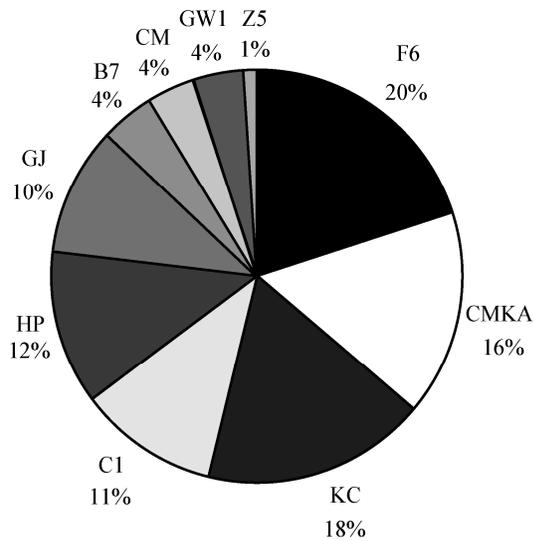


图2 不同培养基菌株含量分布

Figure 2 The distribution of strains in different mediums

所使用的每种培养基均设置了6个NaCl浓度梯度,但是分离到的古菌只存在于15%、20%、25% 3个NaCl浓度梯度(图3),且NaCl浓度为15%时只有HP、KC、CM 3种培养基分离到了的菌株为 *Natrinema*、*Haloterrigena*、*Halorubrum* 和 *Halovivax* 共4个属,占总数的25%;该土样的古菌主要集中在20%的NaCl浓度中,在此NaCl浓度下分离到了 *Haloterrigena*、*Natrialba*、*Halococcus*、*Halorubrum*、*Halovivax*、*Natrinema*、*Natronococcus*、*Halobiforma*、*Halopiger* 和 *Halostagnicola* 共10个

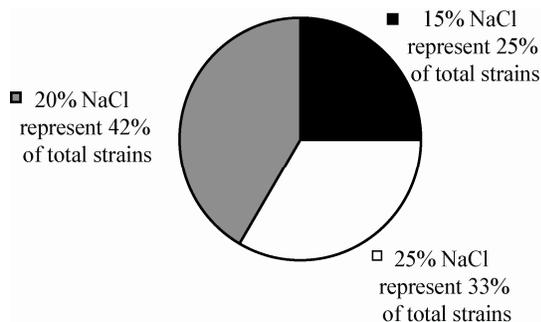


图3 不同NaCl浓度对古菌分离效果的影响

Figure 3 The effect of different NaCl concentrations on archaea separation

Note: 15%, 20%, 25% represent different NaCl concentration.

属,占总数的42%;NaCl浓度为25%时分离到了 *Halostagnicola*、*Haloterrigena*、*Halovivax*、*Natrinema*、*Halorubrum*、*Natrialba*、*Halopiger*、*Haloferax* 共8个属,占总数的33%。其中 *Halococcus*、*Natronococcus* 和 *Halobiforma* 只存在于盐浓度为20%的培养基中, *Haloferax* 只存在于25% NaCl浓度的培养基。其中 *Halovivax*、*Natrinema*、*Haloterrigena*、*Natrialba*、*Halobiforma* 和 *Natronorubrum* 共6个属中存在较多的菌株与已发表菌株的16S rRNA基因相似性低于98%,可能为这几个属里面的潜在新种,其分类地位尚需要通过多相分类手段进一步鉴定。

2.2 菌落形态特征观察结果

本次分离的古菌菌落为圆形(图4)及不规则的褶皱图形;表面突起,边缘光滑的红色、粉红色菌体;菌落不透明;革兰氏染色多数为阴性;显微镜下菌体形态多为球形(图5)。

2.3 稀释F6培养基的分离结果

考虑到样品采集地点环境营养的贫瘠性,对分离效果较好的F6培养基进行梯度营养稀释,通过克隆测序结果得知(表3):1/2 F6培养基中获得了11株古菌,其中3株菌的16S rRNA基因序列与已有效发表菌株的序列相似性小于97%,这11株菌分布于 *Haloterrigena*、*Halococcus*、*Halostagnicola*、*Halovivax*、*Natrialba*、*Halopiger*、*Natronorubrum* 7个属,8个分类单元, *Halococcus* 为该培养基的优势属, *Hcc. salifodinae* 为该属的优势种;1/10 F6培养基中获得了8株古菌,其中有3株菌的16S rRNA基因序列与已有效发表菌株的序列相似性小于98%,分为 *Haloterrigena*、*Halopiger* 和 *Natrinema* 3个属,3个分类单元, *Haloterrigena* 为此培养基的优势种属, *Htg. turkmenica* 为该属的优势种。通过对F6培养基营养成分的稀释发现:随着稀释度的提高,分离获得的菌株数会相应减少。不同稀释度的培养基能分离到不同菌株,说明不同菌株对营养成分的需求存在着一定的差异;此次分离设置了5%、10%、15%、20%、25%、30%等几个NaCl

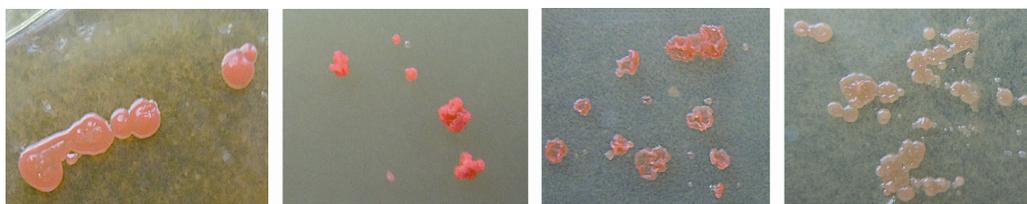


图 4 不同古菌的菌落形态

Figure 4 Archaeas in different colony morphology

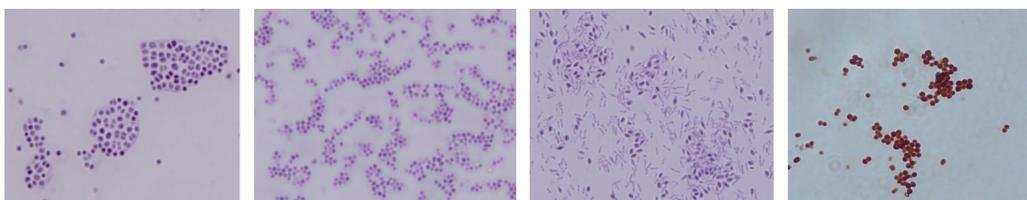


图 5 显微镜下不同古菌的细胞形态

Figure 5 Microscopic morphology of different archaea cells

表 3 F6 培养基不同营养稀释度菌株分布情况

Table 3 Distribution of strains in different nutrients dilutions of F6 medium

| 属名 Genus | 种名 Species | F6 | 1/2 F6 | 1/10 F6 |
|-----------------------|----------------------------|----|--------|---------|
| <i>Halorubrum</i> | <i>Hrr. kocurii</i> | + | - | - |
| | <i>Hrr. saccharovorum</i> | + | - | - |
| | <i>Hrr. aidingense</i> | + | - | - |
| <i>Haloterrigena</i> | <i>Htg. salina</i> | + | + | - |
| | <i>Htg. turkmenica</i> | + | + | + |
| | <i>Htg. thermotolerans</i> | + | - | - |
| | <i>Htg. longa</i> | + | - | - |
| <i>Halobiforma</i> | <i>Hbf. lacisalsi</i> | + | - | - |
| | <i>Htg. turkmenica</i> | + | + | + |
| <i>Natrinema</i> | <i>Nnm. salaciae</i> | + | - | + |
| <i>Natronococcus</i> | <i>Ncc. jeotgali</i> | + | - | - |
| <i>Halopiger</i> | <i>Hpg. aswanensis</i> | + | + | + |
| <i>Halococcus</i> | <i>Hcc. salifodinae</i> | - | + | - |
| <i>Halostagnicola</i> | <i>Hst. larsenii</i> | - | + | - |
| <i>Halovivax</i> | <i>Hvx. ruber</i> | - | + | - |
| <i>Natrialba</i> | <i>Nab. aegyptia</i> | - | + | - |
| <i>Natronorubrum</i> | <i>Nrr. tibetense</i> | - | + | - |

浓度梯度,但是在 10% NaCl 浓度下,只有 1/10 F6 培养基获得了 1 株古菌,该结果说明低营养成分的培养基与低 NaCl 浓度的环境中并不适合于大多数菌株的生长;在 NaCl 浓度为 5%及 30%时并没有分离到任何菌株,随着 NaCl 浓度的增加,分离到

的菌株数增多,且在 20% NaCl 浓度下达到最大值,说明大多数古菌的最适 NaCl 浓度为 20%;在 NaCl 浓度为 25%时,1/10 F6 培养基并没有分离到任何菌株,说明在特殊环境中高含盐量、低营养成分的环境下并不适合古菌生长(图 6)。

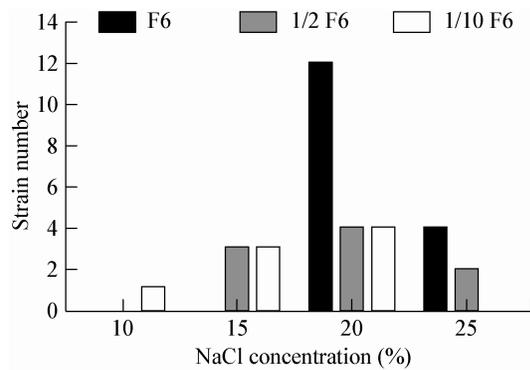


图6 不同NaCl浓度及营养梯度的F6培养基的古菌分离情况

Figure 6 Archaeas separation in different NaCl concentrations and nutrient dilutions of F6 medium

Note: 10%, 15%, 20%, 25% are different NaCl concentrations; F6, 1/2 F6, 1/10 F6 are three different nutrient mediums.

3 讨论

微生物的物种资源极其丰富,这是地球上仅次于昆虫而存在的一个类群,对于微生物多样性的研究,是研究整个生物界多样性的重要组成部分。一直以来,微生物的分离及培养是限制人们开发利用微生物资源的“瓶颈”,对特殊环境下微生物资源的挖掘,必须建立在充足的菌种资源基础上,因此,对放射污染区环境微生物资源的分离显得尤为重要。

针对放射污染区采集土样,采用10种不同的分离培养基对古菌进行筛选,获得了大量的古菌资源,为放射污染区古菌的开发与利用提供了一定的理论基础。通过普通的可培养方法及营养稀释法,共分离获得古菌90株,分布于12个属,26个种,其中34%的古菌的16S rRNA基因序列与已有效发表菌株的序列相似性小于98%,为疑似新种,其分类地位尚未进行确定,有待进一步研究,由实验结果可知,放射污染区古菌种类丰富,具有潜在的开发与利用前景。

在放射污染区分离古菌中以盐陆生菌属(*Haloterrigena*, 36.7%)、纳线菌属(*Natrinema*, 16.7%)、盐红菌属(*Halorubrum*, 12.2%)为主,可定为该土样中的优势种群,这与已报道的国内外许

多研究结果相一致。通过研究发现,不同NaCl浓度对古菌的筛选具有较大影响,从实验结果可知(图6),在NaCl浓度为15%、20%、25%时分离到的菌株分别为:23株(25%)、38株(42%)、30株(33%),且在NaCl浓度为5%、10%、30%时并没有分离到任何的古菌,由此可见在NaCl浓度为20%下能够分离到较多的古菌类群,说明古菌是一种耐盐微生物,在极端环境下能够较好的生长。

通过对菌株分离的培养基进行分析发现,在此次分离菌株所用到的10种分离培养基中,F6培养基分离到的菌株数大于其它9种培养基,其次为KC、CMKA、HP培养基,通过营养成分的比较发现相对于其他的培养基而言,F6培养基中含有壳聚糖和天冬酰胺两种独特的营养成分,壳聚糖在其复杂的空间结构中含有高活性的功能基团,表现出类抗生素的特征,能够抑制多种细菌的生长与活性,经研究发现在浓度为0.1%时,壳聚糖通常对革兰氏阳性菌表现出强烈的抗菌活性,由实验分离到的古菌大多数为G⁻可以证实。因此作者分析,可能由于F6培养基中含有的壳聚糖有效地抑制了其他杂菌的生长,使得生长周期更长的古菌得到了充分的营养成分,才得以能够正常生长。

最后作者考虑到此次采样地点环境的特殊性,对分离效果最好的F6培养基进行营养成分的稀释,最终发现不同营养梯度稀释的培养基内微生物存在着一定的差异性,且低盐、低营养环境下只适合较少数的微生物生长,高盐、高营养环境适合于大多数微生物生长,说明不同的微生物对营养成分的需求不同。

通过对放射污染区古菌分离证明,该地区存在着大量的未获得鉴定的古菌资源。由于可培养方法人为地限定了其生长条件,无法全面地显示出微生物生长的天然环境,造成了某些菌群的富集培养,而另一些微生物缺失,导致部分资源的流失。Zelles等^[17]也提到过,传统的培养方法只能够分离到土壤环境中微生物种数的0.1%或1.0%到10.0%之间,这些并不能够全面地反映整个土壤的微生物群落

结构,因此分离工作的延续不容置疑。在过去的几十年中,我国在古菌的研究中已经取得了较多的研究成果,但是对于我国如此丰富的资源环境而言,古菌的研究才刚刚开始,还需要我们做出更多的努力,才能使其资源达到最大的利用率。

参 考 文 献

- [1] Benlloch S, Martinez-Murcia AJ, Rodriguez-Valera F. Sequencing of bacteria and archaeal 16S rRNA genes directly amplified from a hypersaline environment[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1995, 18(4): 574-581.
- [2] Lizama C, Monteoliva-Sánchez M, Prado B, et al. Taxonomic study of extreme halophilic archaea isolated from the "Salar de Atacama", Chile[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24(3): 464-474.
- [3] MacElroy RD. Some comments on the evolution of extremophiles[J]. *Biosystems*, 1974, 6: 74-75.
- [4] 毛健民, 李季平. 古菌[J]. *生物学教学*, 2002, 27(4): 35-36.
- [5] Yamamura A, Ichimura T, Kamekura M, et al. Molecular mechanism of distinct salt-dependent enzyme activity of two halophilic nucleoside diphosphate kinases[J]. *Biophysical Journal*, 2009, 96(11): 4692-4700.
- [6] 崔恒林. 新疆两盐湖可培养嗜盐古菌多样性与16S rRNA 基因多态性[D]. 北京: 中国科学院微生物研究所博士学位论文, 2007.
- [7] 刘冰冰, 张利莉, 李文均, 等. 新疆罗布泊地区可培养嗜盐古菌多样性及其功能酶筛选[J]. *微生物学报*, 2011, 51(9): 1222-1231.
- [8] 王爽, 杨谦. 大庆盐碱土可培养嗜盐细菌与古菌的多样性及多相分类研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2011.
- [9] Gerald Sk, Chen WH, Chad M, et al. Gene transfer from bacteria and archaea facilitate evolution of an extremophilic eukaryote[J]. *Science*, 2013, 339(6124): 1207-1210.
- [10] 景天爽, 于心科, 李铁刚, 等. 黑潮源区沉积物古菌多样性调查及研究[J]. *地质学报*, 2012, 86(12): 2011-2019.
- [11] Massena R, Murry AE, Preston CM, et al. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic archaea in the Santa Barbara Channel[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(1): 50-56.
- [12] Inagaki F, Takai K, Komatsu T, et al. Archaeology of archaea: geomicrobiological record of Pleistocene thermal events concealed in a deep-sea seafloor environment[J]. *Extremophiles*, 2001, 5(6): 385-392.
- [13] 许学伟, 吴敏, 吴月红, 等. 新疆阿牙克库木湖可培养嗜盐古菌的种群结构[J]. *生态学报*, 2007, 27(8): 3119-3123.
- [14] 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[J]. *生物多样性*, 2006, 14(4): 359-362.
- [15] 张立丰. 新疆达坂城盐湖嗜盐古菌16S rDNA 序列分析和细菌视紫红质基因序列的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学硕士学位论文, 2006.
- [16] 周培瑾, 徐毅, 马允卿, 等. 极端嗜盐菌16S rDNA 的PCR 扩增[J]. *微生物学报*, 1994, 34(1): 6-8.
- [17] Zells L, Bai QY, Beck T, et al. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24(4): 317-323.