

研究报告

新疆尉犁县黑湖嗜盐嗜碱菌的分离及系统发育学分析

依妮皮姑丽·麦麦提依明 迪丽拜尔·托乎提* 阿依安·布胡达西 果海尔·克热木

(新疆师范大学生命科学学院极端环境微生物多样性实验室 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要:【目的】从新疆尉犁县黑湖中筛选分离获得嗜盐嗜碱微生物,并对筛选获得的微生物进行种属鉴定。【方法】采用传统分离鉴定技术,进行形态和生理生化特性研究和基于 16S rRNA 基因的序列分析。【结果】从样品中分离获得可培养嗜盐嗜碱菌 25 株,对其进行鉴定。根据生理生化特征、16S rRNA 基因序列测定和系统发育分析表明,25 株菌分布在古菌 *Halorubrum*、*Haloarcula*、*Natrialba*、*Halohasta* 和 *Halopiger* 等 5 个属。其中优势菌群为 *Halorubrum*,次优势菌群为 *Natrialba*。其中 DH-66 (KU663028)属于 *Halopiger* 属,16S rRNA 基因序列同源性与该属的模式菌株 *Halopiger aswanensis* 56^T 同源性最高,为 95.75%,预示为潜在的新种(新种鉴定将另行报道)。25 株嗜盐嗜碱菌生长条件实验表明,这些菌适应 NaCl 的浓度范围为 15%–30%、最适浓度为 20%–25%,生长的 pH 范围为 7.0–13.0、最适 pH 为 9.0–10.0。各种水解酶类的分析表明,在分离的 25 株菌中产淀粉酶的菌有 5 株占 20%、产蛋白酶的菌有 4 株占 16%、产酯酶可水解吐温 20 的菌有 15 株占 60%、可水解吐温 40 的有 7 株占 28%、可水解吐温 80 的有 4 株占 16%、产过氧化氢酶的菌有 14 株占 56%。9 株菌同时能产 4 种酶,2 株菌同时能产 3 种酶。表明了嗜盐嗜碱菌产酶的多样性。19 株菌硝酸盐还原为阳性。【结论】揭示了新疆尉犁县黑湖嗜盐嗜碱菌生理生化特性的多样性和系统发育多样性,而且蕴藏着较丰富的新的微生物类群,亟待系统研究和进一步开发利用。

关键词:嗜盐嗜碱菌,古菌,新疆尉犁县黑湖,系统进化分析,16S rRNA 基因序列,产酶多样性

Isolation and phylogenetic analysis of haloalkalophilic bacteria in the black lake of Yuli County in Xinjiang

Henipigul Memetimin Dilbar Tohty* Ayan Bughdash Goher Kerem

(College of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

Abstract: [Objective] Screen and isolate Haloalkalophilic microorganisms from the black lake of Yuli County in Xinjiang and take the species identification analysis. [Methods] Traditional isolation and identification techniques were used to study the morphological, physiological and biochemical characteristics and sequence analysis based on 16S rRNA gene were proceeded. [Results] 25 strains of culturable Haloalkalophilic bacteria were separated and identified from the sample. The physiological

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31260002)

*Corresponding author: E-mail: dilbar.th@163.com

Received: July 22, 2016; Accepted: October 17, 2016; Published online (www.cnki.net): October 26, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31260002)

*通讯作者: E-mail: dilbar.th@163.com

收稿日期: 2016-07-22; 接受日期: 2016-10-17; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-10-26

and biochemical characteristics, 16S rRNA gene sequence analysis and phylogenetic analysis showed that these microorganisms distributed in five genera which were *Halorubrum*, *Haloarcula*, *Natrialba*, *Halohasta* and *Halopiger* etc. Among them, the most dominant bacteria group is *Halorubrum*, next is *Natrialba*. Sequence homology of 16S rRNA gene were 95.75% respectively, herald some potential new species (Identification of new species not shown here), the Growth condition experiment of 25 strains of culturable Haloalkalophilic bacteria show that concentration range of NaCl was 15%–30%, with optimum concentration was 20%–25%, the pH range for growth was 7.0–13.0, optimum at 9.0–10.0. The results of physical and biochemical characteristics show that among 25 strains of culturable Haloalkalophilic bacteria, 5 strains belong to amylase producing bacteria, accounted for 20%, 4 strains belong to protease producing bacteria, accounted for 16%, 15 strains belong to esterase Twain hydrolysis 20 producing bacteria, accounted for 60%, 7 strains belong to Twain hydrolysis 40 producing bacteria, accounted for 28%, 4 strains belong to Twain hydrolysis 80 producing bacteria, accounted for 16%. 14 strains belong to hydrogen peroxide producing bacteria, accounted for 56%. 9 strains of these bacteria can produce 4 kinds of enzymes, 2 strains can produce 3 kinds of enzymes at the same time, showed the diversity of enzyme production of the alkaline bacteria. 19 strains of the bacteria were positive for nitrate reduction. **[Conclusion]** The study shows the physiological and biochemical characters diversity and phylogenetic diversity of Haloalkalophilic bacteria in the black lake of Yuli County in Xinjiang, and there are much more abundant new microbial groups in the lake. The study has the regional characteristics and potential application value, recommend that the microbia urgent need systematic research and further develop and utilize.

Keywords: Haloalkalophilic bacteria, Archaea, The black lake of Yuli County in Xinjiang, Phylogenetic analysis, Sequence of 16S rRNA gene, Enzyme diversity

地球上存在着各种不同且一般生物难以生长的极端环境,如高盐、高温、高酸、高碱等环境。这些极端环境中生存着种类丰富的极端微生物,它们为了适应极端环境条件,形成了其独特的细胞结构、生理机能和遗传特性^[1]。嗜盐嗜碱古菌在高盐和碱性条件下能良好生长,在盐浓度低于 10% NaCl 或中性环境中不生长^[2]。对于嗜盐嗜碱菌而言,它们虽然和极端嗜盐菌一样生长需要高盐浓度,细胞壁中没有真正的肽聚糖,细胞膜结构中的脂类只含有醚键不含脂键,但它们又具有既嗜盐又嗜碱、生长仅需低浓度镁离子、细胞膜中含有 C20 和 C25 类异二烯组分的甘油二醚、只有磷脂而无糖脂、G+C 含量偏低等性质,因而嗜盐嗜碱菌不同于中性嗜盐菌^[3-4]。

嗜盐嗜碱菌作为一种新型的、极具应用前景的极端环境微生物资源,近年来受到人们的广泛关注^[5-7]。新疆地区气候干旱,全年的降水量远小于地表的水蒸腾量(1:1 000),因而形成了许多内陆盐湖或碱性盐湖。依地球化学条件的差异,所形成

盐湖的类型各有差别,有碳酸盐型,也有氯化盐型;所含碱金属也不同,有的是 Na,有的是 K 或 Mg 或其它元素^[8]。嗜盐嗜碱古菌是嗜盐古菌的重要类群之一,对该类群的系统研究不仅为微生物生理、遗传和分类等相关内容的研究提供新的课题,也为生命起源及系统进化研究提供新材料^[9]。由于嗜盐嗜碱微生物长期生长在特殊环境下,其生物活性物质也具有独特的性质,是一类重要的资源微生物,同时也是研究生物进化和生物多样性的材料,寻找嗜盐嗜碱菌并分离各种嗜碱酶和新的活性物质已成为国际上微生物研究的一个热点^[5,10]。目前,关于新疆尉犁县黑湖的极端微生物的研究极少,本文以新疆尉犁县黑湖分离的嗜盐嗜碱古菌为研究材料,针对其生理生化特性和系统发育多样性开展研究,为不同环境中嗜盐嗜碱菌资源的研究和合理开发利用提供菌种资源和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 采样:采样地点为新疆尉犁县黑湖

(86°47'40"E、41°14'09"N 至 86°52'10.7"E、41°13'11.7"N)。以湖心为出发点,围绕湖心按不同距离东、南、西、北方向不同深层取表层下 10、20、40、60 cm 深度水样、土样和泥样,水样 pH 为 5.26–6.90、湖心周边土样 pH 为 6.5–6.9、泥样 pH 为 6.0–6.9,盐度为 25%–28%,样品点海拔高度为 853–855 m。装入无菌试样袋密封,将取得的试样保存于 4 °C 用于嗜盐嗜碱古菌筛选。

1.1.2 培养基: 筛选培养基采用 1 号培养基(g/L): Casamino acid 15.0, 柠檬酸三钠 3.0, 谷氨酸 2.5, 氯化钾 2.0, 氯化钠 250.0。固体培养基另加琼脂 15–20 g, pH 为 8.5 (灭菌之前 pH 先用 1% NaOH 调到 7.0–7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 灭菌后再用 5% Na_2CO_3 调 pH 到 8.5)。

1.1.3 主要试剂和仪器: PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成; DNA 聚合酶、DNA Marker、细菌基因组提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒, 购于北京天根生化科技有限公司。专业型梯度 PCR 仪 TPprofessional Standard 型, 德国 Biometra 公司; 电泳仪 Electrophoresis Power Supply EPS 301 型, 瑞典 GE Healthcare 公司; 高速台式离心机 Eppendorf 5424 型, 德国 Eppendorf AG 公司; 紫外可见分光光度计 UV-2810H 型, 尤尼柯(上海)仪器有限公司; 凝胶成像仪 Alphamager EP 型, 美国 Alpha Innotech 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的富集和分离纯化: 称取样品(土样或水样) 1 g 或 1 mL 置于装液量 50 mL 筛选培养基的 250 mL 三角瓶中, 37 °C、180 r/min 摇床培养 3–5 d, 富集菌体, 采用逐级稀释法将富集培养液涂布于固体平板。37 °C 倒置培养 7–10 d 长出单菌落, 挑取单菌落重复划线至得到纯培养物。用斜面划线试管和–80 °C 甘油管两种方法保存。

1.2.2 菌落特征: 将菌株划线接种于 1 号培养基, 37 °C 培养 7–10 d, 观察单菌落的形状、大小、透明度、颜色、边缘和表面特征。

1.2.3 菌体特征: 采用革兰氏染色法, 通过光学

显微镜对菌体形态进行观察, 或用扫描电子显微镜观察。

1.2.4 生长条件检测: 最佳生长盐浓度实验: 在 1 号液体培养基接种, 培养 3 d 后, 1% 接种量接种于含 0%、5%、10%、15%、20%、25%、30% (质量体积比) NaCl 的 1 号液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养 3 d, 3 个平行, 测定菌悬液光吸收值 (OD_{590}), 设置各盐浓度空白对照, 检测 25 株嗜盐嗜碱菌的最适生长盐浓度。

最佳生长 pH 实验: 在 1 号液体培养基接种, 培养 3 d 后, 1% 接种量接种于 pH 分别为 6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0、13.0 和 14.0 的 1 号液体培养基中, 培养基含有以下 25 mmol/L 缓冲体系: MES (pH 5.8–6.5)、PIPES (pH 6.4–7.2)、Tricine (pH 7.0–9.0)、CAPSO (pH 8.9–10.3) 和 CAPS (pH 9.7–11.1)。37 °C、180 r/min 培养 3 d, 3 个平行, 测定菌悬液光吸收值 (OD_{590}), 设置各 pH 值空白对照, 检测 25 株嗜盐嗜碱菌的最适生长 pH 值。

1.2.5 部分生理生化特征: 依据《常见细菌系统鉴定手册》^[11]和《伯杰氏细菌鉴定手册(第 9 版)》^[12]进行常规生理生化鉴定。

1.2.6 16S rRNA 基因序列扩增和系统发育分析: DNA 提取方法参见文献[13]。提取分离出的各菌株基因组 DNA 为模板, 使用古菌通用引物 21F (5'-TTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3') , 1540R (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3') 进行菌株 16S rRNA 基因 PCR, PCR 产物纯化后测序。将获得的序列提交至 EzTaxon-e 数据库进行相似度比较 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)。

1.2.7 构建系统发育树: 通过 Clustal W2 软件包进行多序列匹配排列 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>)。采用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。根据相关软件删除序列匹配排列中的插入和缺失, 根据“Kimura 双参数”方式, 通过序列数据计算进化距离。选择邻近连接法(Neighbour-Joining)对系统进化树进行估算, 通过 1 000 次取样确定。

2 结果与分析

2.1 新疆尉犁县黑湖嗜盐嗜碱菌的分离

通过对新疆尉犁县黑湖周边土壤和湖水样品进行富集培养、分离纯化得到 25 株嗜盐嗜碱菌株。采样的 30 个样品中,从水样中分离了 13 株菌,泥样中分离了 5 株菌,土样中分离 7 株菌。

2.2 形态学特征鉴定结果

分离纯化得到的 25 株嗜盐嗜碱菌生长 7 d 后,菌落湿润或干燥,菌落呈乳白色(8 株)、白色(7 株)或红色(10 株) 3 种颜色,菌落较小、圆形、表面

上隆起、大部分不透明、边缘整齐。细胞为革兰氏阴性。细胞的形状大部分是球状(24 株),少数为杆状(1 株)。

2.3 生长和生理生化特征鉴定结果

所得到的 25 株嗜盐嗜碱菌生理生化特征见表 1。这些菌株生长的 NaCl 浓度范围为 15%–30%,最适浓度为 20%–25%,生长的 pH 范围为 7.0–13.0,最适 pH 为 9.0–10.0。各种水解酶类的分析表明,在分离的 25 株菌中产淀粉酶的菌有 5 株,产蛋白酶的菌有 4 株,产酯酶即水解吐温 20 的菌有 15 株,

表 1 25 株嗜盐嗜碱菌的部分生理生化性质
Table 1 Part physiological and chemical properties of 25 strains of haloalkalophilic bacteria

Strains No.	NaCl range for growth (% , W/V)	Optimum NaCl concentration (% , W/V)	pH range for growth	Optimum pH	Shape	Gram stain	Catalase	Nitrate reduction	Amylase	Protease	Tween 20	Tween 40	Tween 80
YLD-1	20–30	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	+	+	-	+	+	-
YLD-3	15–30	20	7.0–13.0	9.0	Rod	G ⁻	-	+	-	-	+	-	-
YLD-7	15–30	20	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	-	+	-	-	+	-	-
YLD-10	15–30	20	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	+	-	+	+	-	+
YLD-12	15–30	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	-	+	-	-	-	-	-
YLD-15	15–30	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	-	+	-	-	+	-	-
YLD-31	15–30	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	+	-	+	+	-	+
YLD-32	15–30	20	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	+	-	+	+	-	+
YLD-39	15–30	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	-	+	-	-	-	-	-
YLD-40	15–25	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	+	+	-	+	+	-
YLD-45	15–25	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	-	+	-	-	-	-	-
YLD-49	15–30	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	-	-	-	-	-	-
YLD-52	15–25	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	+	-	+	+	-	+
YLD-53	15–30	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	-	+	-	-	-	-	-
YLD-54	15–30	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	-	-	-	-	-	-
YLD-60	15–30	25	8.0–13.0	10.0	Sphere	G ⁻	+	+	+	-	+	+	-
YLD-64	15–25	20	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	+	+	-	+	+	-
DH-66	15–30	20	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	-	-	-	+	-	-
YLD-71	15–25	25	8.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	-	-	-	-	-	-	-
YLD-73	15–25	25	7.0–13.0	10.0	Sphere	G ⁻	+	+	-	-	+	+	-
YLD-76	15–25	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	-	-	-	-	-	-	-
YLD-79	15–25	25	7.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	+	+	-	-	+	+	-
YLD-80	15–30	25	7.0–13.0	10.0	Sphere	G ⁻	+	+	+	-	+	+	-
YLD-82	15–25	25	8.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	-	-	-	-	-	-	-
YLD-85	15–25	25	8.0–13.0	9.0	Sphere	G ⁻	-	+	-	-	-	-	-

注: + : 阳性; - : 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

水解吐温 40 的有 7 株, 水解吐温 80 的有 4 株, 产过氧化氢酶的菌有 53 株。9 株菌同时能产 4 种酶, 2 株菌同时能产 3 种酶, 表明了嗜盐嗜碱菌产酶的多样性。19 株菌硝酸盐还原为阳性。无汞离子抗性。其中 DH-66 的 NaCl 浓度范围为 15%–30%、最适浓度为 20%, 生长 pH 范围为 7.0–13.0、最适 pH 为 9.0。能产蛋白酶, 可水解吐温 20, 不产淀粉酶, 不水解吐温 40 和 80, 不产过氧化氢酶, 硝酸盐还原为阴性。

2.4 16S rRNA 基因序列与系统发育分析

使用古菌通用引物对获得的 25 株嗜盐嗜碱菌的 16S rRNA 基因序列进行单向测序并获得有效序列, 长度均大于 700 bp, 将获得的序列提交至 EzTaxon-e 数据库(<http://www.ezbiocloud.net/>

eztaxon), 调出相似性最高相关菌株的 16S rRNA 基因序列。通过 TA 克隆对其中最高相似性低于 98% 的 16S rRNA 基因序列进行了全长(1 500 bp)测序以增加比对的可靠性。结合 16S rRNA 基因序列系统发育分析和生理生化结果表明, 所分离获得的 25 株嗜盐嗜碱菌鉴定归属于嗜盐古菌 *Halorubrum*、*Haloarcula*、*Natrialba*、*Halohasta* 和 *Halopiger* 等 5 个属, 其中 *Halorubrum* 属(11 株, 占总菌株的 44%) 在新疆尉犁县黑湖可培养嗜盐嗜碱菌中的 5 个属中占优势, 其次为 *Natrialba* 属(10 株, 40%)、*Halohasta* 属(2 株, 8%)、其余菌株各 1 株, 分属于 *Haloarcula* 和 *Halopiger* 属。从具体的系统发育分析来看(表 2 和图 1), 这些菌株与 *Halorubrum lipolyticum*、*Halorubrum californiense*、*Halorubrum*

表 2 测序菌株的同源性分析
Table 2 Homology analysis of the tested strains

菌株号 No. of Strain	最相似的菌株 The most closest match	登录号 GenBank accession No.	相似率 Similarity (%)
YLD-1	<i>Halorubrum chaoviator</i>	KX833939	99
YLD-3	<i>Natrialba hulunbeirensis</i>	KX833940	98
YLD-7	<i>Haloarcula hispanica</i>	KX833941	99
YLD-10	<i>Natrialba chahannaensis</i>	KX833942	99
YLD-12	<i>Natrialba aegyptia</i>	KX833943	98
YLD-15	<i>Natrialba hulunbeirensis</i>	KX833944	98
YLD-31	<i>Natrialba chahannaensis</i>	KX833945	99
YLD-32	<i>Natrialba chahannaensis</i>	KX833946	98
YLD-39	<i>Natrialba aegyptia</i>	KX833947	99
YLD-40	<i>Halorubrum chaoviator</i>	KX833948	99
YLD-45	<i>Halorubrum californiense</i>	KX833949	99
YLD-49	<i>Halohasta litorea</i>	KX833950	99
YLD-52	<i>Natrialba chahannaensis</i>	KX833951	99
YLD-53	<i>Natrialba aegyptia</i>	KX833952	99
YLD-54	<i>Halohasta litorea</i>	KX833953	99
YLD-60	<i>Halorubrum chaoviator</i>	KX833954	99
YLD-64	<i>Halorubrum chaoviator</i>	KX833955	99
DH-66	<i>Halopiger aswanensis</i>	KU663028	95
YLD-71	<i>Halorubrum persicum</i>	KX833956	98
YLD-73	<i>Halorubrum chaoviator</i>	KX833957	99
YLD-76	<i>Halorubrum lipolyticum</i>	KX833958	98
YLD-79	<i>Halorubrum chaoviator</i>	KX833959	100
YLD-80	<i>Halorubrum chaoviator</i>	KX833960	100
YLD-82	<i>Halorubrum lipolyticum</i>	KX833961	99
YLD-85	<i>Natrialba aegyptia</i>	KX833962	99

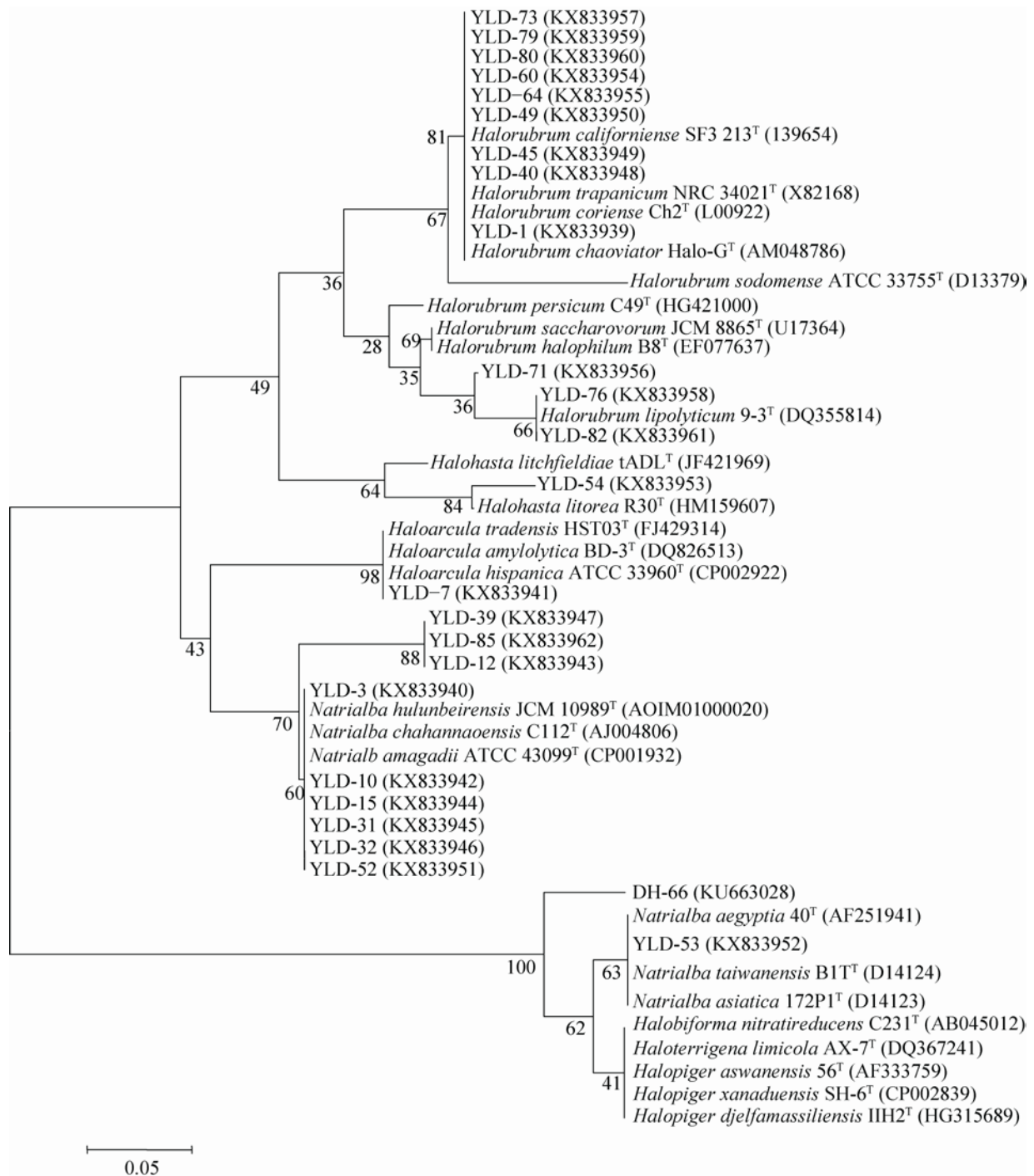


图 1 新疆勒尉犁县黑湖嗜盐嗜碱菌的 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of haloalkalophilic isolates from the black lake of Yuli County in Xinjiang

注：括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号；系统树分支点处的数字代表系统树的自举值(1 000 次重复)；标尺长度代表遗传距离。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those reference strains and screened strains; The numbers on the branch points of the phylogenetic tree represented bootstrap values of the tree (1 000 replicates); Scale length represented genetic distance.

chaoviator、*Halorubrum persicum*、*Haloarcula hispanica*、*Halohasta litorea*、*Natrialba hulunbeirensis*、*Natrialba chahannaensis*、*Natrialba aegyptia* 和 *Halopiger aswanensis* 等 10 个不同的种的系统发育关系相近。其中菌株 DH-66 (KU663028) 属于 *Halopiger* 属, 与属中的模式菌株 *Halopiger aswanensis* 56^T 同源性最高, 为 95.75%, 预示为嗜盐菌新种, 以嗜盐嗜碱菌新种鉴定最小标准, 进行实验分析和验证(数据未在本研究介绍)。

3 讨论

为了解新疆尉犁县黑湖嗜盐嗜碱菌菌种资源特征, 挖掘有用资源类群分离并获得嗜盐嗜碱菌菌种资源, 对采集样品分离和纯化, 共获得了 25 株嗜盐嗜碱菌。并对 25 株菌株的个体形态观察及生理生化特性检测, 对 16S rRNA 基因序列进行分析并构建了系统进化树。所分离获得的 25 株嗜盐嗜碱菌鉴定分别归属于 *Natrialba*、*Halorubrum*、*Halohasta*、*Haloarcula* 以及 *Halopiger* 5 个属, 这些菌分别与 *Halorubrum lipolyticum*、*Halorubrum californiense*、*Halorubrum chaoviator*、*Halorubrum persicum*、*Haloarcula hispanica*、*Halohasta litorea*、*Natrialba hulunbeirensis*、*Halopiger aswanensis*、*Natrialba chahannaensis* 及 *Natrialba aegyptia* 等 10 个种相似性较高。其中 *Halorubrum* 属在新疆尉犁县黑湖嗜盐嗜碱菌中的 5 个属中占优势。通过与已报道的新疆几大盐湖嗜盐菌数据的系统进化地位分析, 尉犁县黑湖与艾比湖^[14]、艾丁湖^[15]、达坂城盐湖^[16]、罗布泊^[17]等 4 个盐湖中共有属是 *Halorubrum*。与三大盐湖比(罗布泊除外)*Haloarcula* 也是共有的, 而艾比湖除外, 共有属为 *Natrialba*。与艾丁湖、达坂城盐湖、艾比湖、罗布泊四大盐湖相比尉犁县黑湖特有的属是 *Halopiger*。从新疆尉犁县黑湖所分离的优势嗜盐嗜碱菌属以及特有属 *Halopiger* 有着自身的特殊性^[18], 同时也具有新疆各地区其他盐环境(盐湖、盐碱湿地以及盐矿场)共同的特征。

通过对新疆尉犁县黑湖嗜盐嗜碱菌的分离及系统发育学分析初步研究, 充分证明了新疆尉犁县黑湖嗜盐嗜碱菌种群的多样性、丰富性、特殊性及潜在的新类群。目前各国对极端环境微生物资源的研究集中在资源多样性、活性物质多样性、基因多样性, 从极端环境发现的新类群及活性物质越来越体现新的功能, 因此开展资源挖掘与利用研究已深入到抗肿瘤活性物质筛选^[19]、生物修复^[20-21]、环境污染治理^[22]等多个领域, 具有重要的应用价值。本研究对于今后进一步研究极端环境微生物资源具有重要的现实意义, 为新疆嗜盐微生物资源的深入认识和进一步开发利用提供了菌种资源, 也为研究生物进化和生物多样性提供了重要材料。寻找并分离嗜碱酶是目前研究的热点, 嗜盐嗜碱微生物的产酶多样性和活性物质多样性及地区分布特性具有参考价值。本实验分离获得的嗜盐嗜碱菌资源展现了菌株产蛋白酶、酯酶、淀粉酶和过氧化氢酶的特点, 为新型生物催化剂的研究提供了丰富多样的研究材料。目前, 关于新疆尉犁县黑湖的极端微生物资源研究极少, 本研究从该地区挖掘具有新功能和新机制的极端环境微生物资源及生物酶类, 将为促进微生物产业实践化提供依据。

参 考 文 献

- [1] Wang JM, Guan TW, He JZ, et al. Research progress of alkaliphile bacterium[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2008, 54(1): 83-86 (in Chinese)
王建明, 关统伟, 贺江舟, 等. 嗜碱菌的研究进展及利用前景[J]. 陕西农业科学, 2008, 54(1): 83-86
- [2] Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63(4): 735-750
- [3] Duckworth AW, Grant WD, Jones BE, et al. Phylogenetic diversity of soda lake alkaliphiles[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1996, 19(3): 181-191
- [4] Allen MA, Goh F, Burns BP, et al. Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity of smooth and pustular microbial mat communities in the hypersaline lagoon of Shark Bay[J]. Geobiology, 2009, 7(1): 82-96
- [5] Santos H, Costa MSD. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(9): 501-509
- [6] Ochseneiter T, Pfeifer F, Schleper C. Diversity of Archaea in hypersaline environments characterized by molecular-phylogenetic and cultivation studies[J]. Extremophiles, 2002, 6(4): 267-274
- [7] Liu YJ, Lin Y, Wu XY. The general research situation of extreme microbiology[J]. Industrial Microbiology, 2000, 30(3): 53-55 (in

- Chinese)
柳耀建, 林影, 吴晓英. 极端微生物的研究概况[J]. 工业微生物, 2000, 30(3): 53-55
- [8] Maturrano L, Santos F, Rosselló-Mora R, et al. Microbial diversity in Maras salterns, a hypersaline environment in the Peruvian Andes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(6): 3887-3895
- [9] Zhang LF, Xiao YQ, Liu HQ, et al. Progress in the studies of Haloalkaliphilic Archaea[J]. Journal of Xinjiang Normal University, 2005, 24(3): 89-91 (in Chinese)
张立丰, 肖延青, 刘会强, 等. 嗜盐嗜碱菌的研究进展[J]. 新疆师范大学学报, 2005, 24(3): 89-91
- [10] Liu ZH. Current Microbiology[M]. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 2008 (in Chinese)
刘志恒. 现代微生物学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2008
- [11] Dong XZ, Cai MY. The Identification Manual of Systematic Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
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
- [12] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 第8版. 北京: 科学出版社, 1984
- [13] Li L, Wu M, Qiao SY, et al. Cloning and expression of the Bacteriorhodopsin gene[J]. Journal of Zhejiang University (Engineering Science), 2001, 35(3): 324-327 (in Chinese)
李凌, 吴敏, 乔守怡, 等. br 基因的克隆及表达[J]. 浙江大学学报: 工学版, 2001, 35(3): 324-327
- [14] Xu XW, Wu M, Dilbar T, et al. Halophilic archaea diversity of Aibi Lake and Yiwu Lake in Xinjiang[J]. Biodiversity Science, 2006, 14(4): 359-362 (in Chinese)
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] Cui HL, Yang Y, Dilbar T, et al. Biodiversity of halophilic archaea isolated from two salt lakes in Xinjiang region of China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(2): 171-176 (in Chinese)
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[J]. 微生物学报, 2006, 46(2): 171-176
- [16] Chen J. Biodiversity of culturable halophilic archaea isolated from *Tamarix* rhizosphere soil in Lop Nur region of Xinjiang, China[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Normal University, 2009 (in Chinese)
陈瑾. 新疆罗布泊地区柽柳属(*Tamarix*)植物根际土壤中可培养嗜盐古菌多样性研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学硕士学位论文, 2009
- [17] Zhang LF. Study on salt halophilic archaea 16S rDNA sequence analysis and bacteriorhodopsin gene sequences isolated from the samples of Da Bancheng saline lake in Xinjiang[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Normal University, 2006 (in Chinese)
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研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学硕士学位论文, 2006
- [18] Hezayen FF, Gutiérrez MC, Steinbüchel A, et al. *Halopiger aswanensis* sp. nov., a polymer-producing and extremely halophilic archaeon isolated from hypersaline soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(3): 633-637
- [19] Selama O, Amos GCA, Djenane Z, et al. Screening for genes coding for putative antitumor compounds, antimicrobial and enzymatic activities from haloalkalitolerant and haloalkaliphilic bacteria strains of Algerian Sahara Soils[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 317524
- [20] Berben T, Sorokin DY, Ivanova N, et al. Complete genome sequence of Thioalkalivibrio paradoxus type strain ARh1T, an obligately chemolithoautotrophic haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium isolated from a Kenyan soda lake[J]. Standards in Genomic Sciences, 2015, 10: 105
- [21] Berben T, Sorokin DY, Ivanova N, et al. Partial genome sequence of Thioalkalivibrio thiocyanodenitrificans ARhD1T, a chemolithoautotrophic haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium capable of complete denitrification[J]. Standards in Genomic Sciences, 2015, 10: 84
- [22] Mabrouk MEM, Arayes MA, Sabry SA. Hexavalent chromium reduction by chromate-resistant haloalkaliphilic *Halomonas* sp. M-Cr newly isolated from tannery effluent[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2014, 28(4): 659-667