

## 研究报告



## 安徽定远盐矿可培养嗜盐微生物多样性

陈礼楠<sup>1</sup> 李峰<sup>2</sup> 孙思琪<sup>1</sup> 许瑶<sup>1</sup> 陈绍兴<sup>\*1</sup>

1 安徽师范大学生命科学学院 安徽 芜湖 241000

2 中盐东兴盐化股份有限公司 安徽 定远 233201

**摘要:**【背景】嗜盐微生物多生活于高盐环境, 具有独特的生理代谢特征, 是一类重要的极端环境微生物资源。【目的】为更好地认识我国陆相盐矿的嗜盐微生物多样性组成, 更好地开发利用嗜盐微生物资源积累丰富的微生物菌种。【方法】对安徽定远盐矿盐芯样品进行嗜盐微生物的纯培养分离, 并对所分离菌株进行基于 16S rRNA 基因的测序和序列相似性分析, 并对所分离菌株进行物种多样性分析。在此基础上, 对代表菌株进行菌落形态和耐盐度及酶活测定。【结果】通过纯培养共分离获得了嗜盐微生物 264 株, 其中嗜盐古菌 150 株, 占 56.8%; 嗜盐细菌 114 株, 占 43.2%。嗜盐古菌物种分别来自于 *Halorubrum*、*Halopenitus*、*Haloterrigena*、*Natrinema*、*Natronoarchaeum* 和 *Natronomonas* 等 6 个属; 嗜盐细菌物种分别来自于 *Pseudomonas*、*Aliifodinibius*、*Halobacillus*、*Halomonas* 和 *Halospina* 等 5 个属。通过代表菌株的酶活平板检测, 发现产胞外蛋白酶菌株 1 株, 酯酶 1 株, 淀粉酶 2 株; 能液化明胶菌株 2 株。在物种多样性组成方面, 发现嗜盐古菌的物种多样性指数高于嗜盐细菌。【结论】本研究对我国安徽定远陆相盐矿的可培养嗜盐微生物多样性进行探究, 积累了丰富的嗜盐微生物菌株资源。

**关键词:** 盐矿, 嗜盐微生物, 嗜盐古菌, 嗜盐细菌, 物种多样性

## Species diversity of culturable halophilic microorganisms isolated from Dingyuan salt mine, Anhui

CHEN Li-Nan<sup>1</sup> LI Feng<sup>2</sup> SUN Si-Qi<sup>1</sup> XU Yao<sup>1</sup> CHEN Shao-Xing<sup>\*1</sup>

1 College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu, Anhui 241000, China

2 CNSIC Dongxing Salt and Chemical Co. Ltd., Dingyuan, Anhui 233201, China

**Abstract:** [Background] Halophilic microorganisms living in hypersaline environment, and conceiving unique physiological and metabolic characteristics, are one type of important microbial resources from extreme environment. [Objective] To uncover species diversity of cultivable halophilic microorganisms in athalassohaline salt mines in China, and to accumulate strains of halophilic microorganisms, this research was conducted. [Methods] Culture-dependent approach was applied to analyze the halophilic microorganisms from salt core samples of Dingyuan salt mine, Anhui province, China. Classification of the culturable halophilic microorganisms was performed based on 16S rRNA gene sequencing and

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31460003); Anhui Provincial Key Laboratory of the Conservation and Exploitation of Biological Resources (591601)

**\*Corresponding author:** E-mail: chensx@ahnu.edu.cn

**Received:** 29-09-2018; **Accepted:** 26-03-2019; **Published online:** 19-04-2019

**基金项目:** 国家自然科学基金(31460003); 安徽省重要生物资源保护与利用开放课题(591601)

**\*通信作者:** E-mail: chensx@ahnu.edu.cn

**收稿日期:** 2018-09-29; **接受日期:** 2019-03-26; **网络首发日期:** 2019-04-19

sequence similarity search. On this basis, some representative strains were subjected to colony morphology, salt tolerance and enzyme activity assay. **[Results]** In total, 264 strains were obtained via culture-dependent approach, of which 150 strains were classified as halophilic archaea, accounting for 56.8%, and 114 strains were affiliated to halophilic bacteria, accounting for 43.2%. Results of 16S rRNA gene sequence similarity search showed that those strains belonged to six haloarchaeal genera, i.e. *Halorubrum*, *Halopenitus*, *Haloterrigena*, *Natrinema*, *Natronoarchaeum* and *Natronomonas*, and five bacterial genera, i.e. *Pseudomonas*, *Aliifodidinibius*, *Halobacillus*, *Halomonas* and *Halospina*. Through the enzyme activity assay, one strain producing extracellular protease, one strain conceiving esterase activity and two strains presenting amylase activity, two strains hydrolyzing the gelatin, were found among these selected species. Furthermore, species diversity index of the halophilic archaea was higher than that of halophilic bacteria. **[Conclusion]** This study reported the species diversity of the culturable halophilic microorganisms isolated from the Dingyuan athalassohaline salt mine (Anhui, China). This study gives us a better understanding of the microbial resources in athalassohaline salt mines, and accumulates rich microbial resources for further application.

**Keywords:** Salt mine, Halophiles, Halophilic archaea, Halophilic bacteria, Species diversity

极端微生物是能适应极端环境的微生物类群, 它们具有特殊的遗传背景和代谢途径, 能够产生各种具有特殊功能的酶类及其他活性物质。研究极端微生物的特性对探索生命的起源、微生物的育种及开发利用等具有重要意义<sup>[1]</sup>。由于其生境的特殊性, 极端微生物的生命起源及进化机制等方面对其他领域的生物研究具有重要的启示作用<sup>[2]</sup>。此外, 极端微生物存在的原理本身也具有极大的应用价值, 对极端微生物生存的特殊机制及特殊产物的研究将促进新的技术手段的发展, 从而可以带来更大的应用价值<sup>[3]</sup>。嗜盐微生物是指在高盐环境生长的微生物, 它们广泛分布于地球的各种高盐环境, 如海水、盐湖、盐碱地、盐矿、海边晒盐场和海产品等<sup>[4]</sup>。随着现代分子生物学技术的发展, 嗜盐微生物独特的细胞结构、生理机能和代谢机制等被进一步揭开面纱<sup>[5]</sup>。它们在合成生物材料、生物医学和环境治理等领域发挥越来越重要的作用<sup>[6-9]</sup>。

近年来, 国内外均有学者对盐湖、盐碱地、晒盐场等高盐环境中的微生物组成进行研究, 分离到 *Halorubrum*、*Natronococcus*、*Natronorubrum*、*Haloterrigena*、*Halorbhabdus*、*Halobiforma*、*Haloarcula* 和 *Haloferxa* 等属的物种, 说明该环境中的嗜盐微生物资源丰富<sup>[10-14]</sup>。盐矿这一独特的生境形成几千万年前, 是高盐环境的重要代表。因其

样品相对较难获取, 研究相对较少。

2006 年, 田新朋等用纯培养的方法从云南盐矿分离到 *Halorubrum*、*Natronococcus*、*Natrialba* 和 *Halalkalicoccus* 等 4 个属的物种<sup>[15]</sup>。2011 年, Gramain 等在研究智利 Salar Grande 盐矿的盐芯样品时, 从中发现有 *Halobacterium* 属物种分布<sup>[16]</sup>。2013 年, Xiao 等采用免培养的方法对云南盐矿的细菌和古菌物种多样性分布进行研究, 发现不同地点盐矿样品物种多样性存在较大差异<sup>[17]</sup>。2015 年, Chen 等报道了一个来自于云南盐矿的新物种 *Halorubrum yunnanense*<sup>[18]</sup>。以上研究均表明盐矿中蕴藏着丰富的微生物资源。

安徽定远盐矿位于我国中部, 具有钾、镁、溴含量低等陆相盐湖沉积盐矿的典型特征。该盐矿含盐层形成于早第三纪晚古新世——渐新世, 以河湖相沉积为主<sup>[19-20]</sup>。本研究将以该盐矿为研究对象, 采集盐芯样品, 采用高盐培养基进行纯培养分离, 观察菌株纯培养物的菌落及显微形态特征, 并对菌株的可生长盐浓度、产酶特性等进行研究。对所分离的菌株进行基于 16S rRNA 基因序列分析的初步鉴定, 并对该盐矿中的嗜盐微生物群落组成及随埋深不同的分布特征进行初步分析。这对我们认识盐矿这一特殊的极端高盐环境中微生物物种多样性组成具有重要的理论意

义;对极端环境微生物资源的开发和利用具有潜在的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

盐芯样品采集自安徽省定远县东兴乡。样品的基本信息如表 1 所示,其中编号 25 和 Z24 为不同钻井,Z24-3 和 Z24-8 为同一钻井不同深度的盐芯样品。

### 1.2 培养基及培养条件

用于嗜盐微生物分离的培养基为 AS-168 培养基(g/L)<sup>[21]</sup>:酸水解酪蛋白氨基酸 5.0、酵母粉 5.0、谷氨酸单钠 1.8、柠檬酸钠 3.0、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20.0、KCl 2.0、NaCl 200.0、FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.036 和 MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.003 6。pH 调至 8.0,1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min。配制固体培养基时,在灭菌前加入琼脂粉 15.0 g。

### 1.3 主要试剂和仪器

PCR Mix,北京博迈德基因技术有限公司。电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

### 1.4 样品预处理及菌株的分离

#### 1.4.1 样品预处理

盐矿样品表面消除处理。首先,将完整的盐矿样品放入 NaOH (10 mol/L)溶液中,洗涤 3 次,每次 1 min;再将盐矿样品用蒸馏水冲洗 3 次;然后,将盐矿样品放入 HCl (10 mol/L)溶液中,洗涤 3 次,每次 1 min;将剩余的盐矿样品放入蒸馏水中,冲洗 3 次。将最终剩余盐矿样品彻底溶解于灭菌的浓度为 10% NaCl 溶液中。

### 1.4.2 菌株分离

吸取 500 μL 上述溶盐矿溶液,直接涂布于 AS-168 固体平板上。用塑料薄膜封口,于 37 °C 培养箱中倒置培养 3–4 周。观察,待菌落形成后,用灭菌牙签挑取平板上所形成的单菌落,进行二次或多次平板划线分离,获得每个菌株的纯培养物。

### 1.5 生长的 NaCl 浓度范围

每个物种选取 1 株为代表,接种于含有不同 NaCl 浓度(0.1、0.2、1.4、1.7、2.5、3.4、4.3、5.0 mol/L)的液体 AS-168 培养基中,37 °C、180 r/min 培养 1 周,测定 OD<sub>600</sub> 值。

### 1.6 形态学特征

#### 1.6.1 菌落形态

将菌株划线于普通 AS-168 固体平板上,37 °C 培养。菌落形成后,观察并记录菌落特征,包括大小、颜色、透明度和是否凸起等。

#### 1.6.2 革兰氏染色及显微观察

对嗜盐古菌采用 2%乙酸固定的改进型革兰氏染色法<sup>[22]</sup>,对细菌采用常规的染色观察法。

### 1.7 生理生化特性

#### 1.7.1 氧化酶

将新鲜菌苔涂抹于用 1%的对氨基二苯胺盐酸盐水溶液和 1%的 α-萘胺溶液混合溶液浸润的滤纸上,检测氧化酶活性<sup>[23]</sup>。

#### 1.7.2 触酶

用 5%的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液覆盖新鲜菌苔方法检测触酶活性<sup>[23]</sup>。

#### 1.7.3 淀粉酶

在 AS-168 培养基中添加 1% (质量体积比)的

表 1 盐芯样品采集点地理信息

Table 1 Geographical location of sampling sites

样品 Sample	含盐量 Salinity (%)	地理位置 Geographical location	深度 Depth (m)	采样日期 Sampling date
25	23.50	E32°30'24.60", N117°29'48.54"	—	23/05/2016
Z24-3	99.50	E32°30'23.88", N117°29'44.16"	381–385	23/05/2016
Z24-8			305–310	23/05/2016

注:—:无数据.

Note:—: No data.

可溶性淀粉, 制作淀粉平板。菌种划线接种于该平板上, 长出菌苔后, 用碘液检测菌苔周围的透明圈。

#### 1.7.4 明胶酶

在 AS-168 培养基中添加 1% (质量体积比) 的明胶, 制作明胶平板。待划线长出菌苔后, 用 Frazier 试剂检测明胶液化情况<sup>[24]</sup>。

#### 1.7.5 蛋白酶

在 AS-168 培养基中添加 1% (质量体积比) 的脱脂奶粉制作牛奶平板, 待划线长出菌苔后, 观察菌落周围是否有蛋白水解圈<sup>[24]</sup>。

#### 1.7.6 酯酶

在 AS-168 培养基中添加 1% (质量体积比) 的吐温 80, 制作吐温 80 平板, 划线, 观察菌落周围有无晕圈产生<sup>[24]</sup>。

### 1.8 基于 16S rRNA 基因的初步鉴定

#### 1.8.1 总 DNA 制备

嗜盐古菌(纯水裂解型)总 DNA 制备: 用灭菌牙签刮取约 1 cm 长的菌苔, 重悬于 50  $\mu$ L 无菌水中, 充分混匀, 嗜盐古菌细胞在低渗条件下迅速裂解, 所形成的细胞裂解物即可作为嗜盐古菌(纯水裂解型)总 DNA。嗜盐细菌及纯水不裂解型嗜盐古菌总 DNA 制备: 采用相同的方法制备菌悬液, 再用等体积的酚氯仿溶液(苯酚:氯仿=1:1, 体积比)抽提, 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清即为嗜盐细菌及纯水不裂解型嗜盐古菌总 DNA。

#### 1.8.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增及测序

以上述制备的嗜盐古菌或嗜盐细菌总 DNA 为 PCR 扩增模板, 分别以 18F/1518R<sup>[25]</sup>和 27F/1492R<sup>[26]</sup>为嗜盐古菌和嗜盐细菌 16S rRNA 基因 PCR 扩增引物(表 2)。PCR 反应体系(50.0  $\mu$ L): 总 DNA 模板(20 ng/ $\mu$ L) 2.0  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2.5  $\mu$ L, 2 $\times$ PCR Mix 25.0  $\mu$ L, 无菌水 18.0  $\mu$ L。

表 2 PCR 扩增引物

Table 2 Primers used in PCR amplification

引物	序列
Primer	Sequence (5'→3')
18F	ATTCCGGTTGATCCTGCC
1518R	AGGAGGTGATCCAGCCGC
27F	AGAGTTTGATCMTGGCT
1492R	CGGTTACCTTGTTACGACTT

PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 45 s, 53  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1.5 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。

PCR 扩增产物分析: 取 5.0  $\mu$ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测; 检测成功的样品送昆明擎科生物科技有限公司, 采用 18F (嗜盐古菌)或 27F (嗜盐细菌)进行单项测序。

### 1.9 基于 16S rRNA 基因序列的分类学分析

采用 BioEdit<sup>[27]</sup>软件打开测序峰图文件, 去除测序结果两端峰型较差的序列, 选取中间可信度较高的约 1 100 bp 序列, 导入原核生物分类分析在线软件 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>)<sup>[28]</sup>, 进行基于 16S rRNA 基因序列信息的分类地位初步分析。

在原核生物分类地位处理上, 对于嗜盐古菌和嗜盐细菌分别以高于 98.5%和 97%的 16S rRNA 基因序列相似度作为确定物种的标准。

#### 1.10 物种多样性分析

根据基于 16S rRNA 基因序列确定的菌株分类地位的结果, 对分离自定远盐矿的嗜盐古菌和嗜盐细菌进行物种多样性分析。通过测定香农-威纳指数(Shannon-Wiener index)和辛普森指数(Simpson index)的方法, 从总体、嗜盐古菌和嗜盐细菌 3 个层面, 比较不同钻井(Z24 和 25)和同一钻井不同深度盐芯样品(Z24-3 和 Z24-8)的物种多样性组成差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 定远盐矿可培养嗜盐微生物分布情况统计

#### 2.1.1 可培养嗜盐微生物物种分布

经纯培养分离, 从定远盐矿盐芯样品中共获得嗜盐菌 264 株。16S rRNA 基因序列相似性分析结果显示, 其中嗜盐古菌 150 株, 嗜盐细菌 114 株。嗜盐古菌分别属于 *Halopenitus*、*Halorubrum*、*Haloterrigena*、*Natrinema*、*Natronoarchaeum* 和 *Natronomonas* 等 6 个属。嗜盐细菌分别属于 *Aliifodinibius*、*Halobacillus*、*Halomonas*、*Halospina* 和 *Pseudomonas* 等 5 个属。

如表 3 所示, 嗜盐古菌 6 个属分别隶属于盐杆

表 3 定远盐矿所分离嗜盐微生物分类地位及菌株分布

Table 3 Taxonomic position and distribution of halophiles isolated from Dingyuan salt mine

类型 Types	分类学地位 Taxonomic position	菌株数量 与比例 Number and proportion		样品 25 的菌株 数量与比例 Number and proportion of strains isolated from sample 25		样品 Z24-8 的菌 株数量与比例 Number and proportion of strains isolated from sample Z24-8		样品 Z24-3 的菌 株数量与比例 Number and proportion of strains isolated from sample Z24-3	
		菌株 数 Strains	所占比例 (%) Proportion	菌株 数 Strains	所占比例 (%) Proportion	菌株 数 Strains	所占比例 (%) Proportion	菌株 数 Strains	所占比例 (%) Proportion
嗜盐古菌 <i>Haloarchaea</i>	<i>Archaea, Euryarchaeota, Halobacteria, Haloferacales, Halorubraceae, Halorubrum</i>	95	36.0	80	37.4	15	32.6	0	0.0
	<i>Archaea, Euryarchaeota, Halobacteria, Halobacteriales, Halobacteriaceae, Natronoarchaeum</i>	35	13.3	30	14.0	2	4.3	3	75.0
	<i>Archaea, Euryarchaeota, Halobacteria, Natrionalbales, Natrionalbaceae, Natrinema</i>	7	2.7	6	2.8	0	0.0	1	25.0
	<i>Archaea, Euryarchaeota, Halobacteria, Natrionalbales, Natrionalbaceae, Haloterrigena</i>	6	2.3	6	2.8	0	0.0	0	0.0
	<i>Archaea, Euryarchaeota, Halobacteria, Halobacteriales, Haloarculaceae, Natronomonas</i>	6	2.3	6	2.8	0	0.0	0	0.0
	<i>Archaea, Euryarchaeota, Halobacteria, Haloferacales, Halorubraceae, Halopenitus</i>	1	0.4	0	0.0	1	2.2	0	0.0
合计 Total		150	57.0	128	59.8	18	39.1	4	100.0
嗜盐细菌 <i>Halophilic bacteria</i>	<i>Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, Pseudomonas</i>	107	40.5	80	37.4	27	58.7	0	0.0
	<i>Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Oceanospirillales, Halomonadaceae, Halomonas</i>	3	1.1	2	0.9	1	2.2	0	0.0
	<i>Bacteria, Balneolaeota, Balneolia, Balneolales, Balneolaceae, Aliifodinibius</i>	2	0.8	2	0.9	0	0.0	0	0.0
	<i>Bacteria, Firmicutes, Bacilli, Bacillales, Bacillaceae, Halobacillus</i>	1	0.4	1	0.5	0	0.0	0	0.0
	<i>Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Oceanospirillales, Hahellaceae, Halospina</i>	1	0.4	1	0.5	0	0.0	0	0.0
合计 Total		114	43.0	86	40.2	28	60.9	0	0.0
总计 Total		264	100.0	214	100.0	46	100.0	4	100.0

注：以上的分类学地位是基于 16S rRNA 基因序列相似性分析推断。Z24-3 和 Z24-8 两个样品的埋深分别为 381–385 m 和 305–310 m。

Note: Taxonomic positions of halophiles were inferred based on the 16S rRNA gene sequence similarity analysis. Buried depths of Z24-3 and Z24-8 are 381–385 m and 305–310 m, respectively.

菌纲(*Halobacteria*)的 *Haloferacales*、*Natrialbales* 和 *Halobacteriales* 3 个目; *Halorubraceae*、*Halobacteriaceae*、*Natrialbaceae* 和 *Haloarculaceae* 4 个科。嗜盐细菌 5 个属分别隶属于 *Balneolales*、*Bacillales*、*Oceanospirillales* 和 *Pseudomonadales* 4 个目; *Pseudomonadaceae*、*Halomonadaceae*、*Balneolaceae*、*Bacillaceae* 和 *Hahellaceae* 5 个科。

### 2.1.2 可培养嗜盐微生物优势物种分析

在所分离嗜盐古菌中,来自于 *Halorubrum*、*Natronoarchaeum*、*Natrinema*、*Haloterrigena*、*Natronomonas* 和 *Halopenitus* 属的菌株分别有 95、35、7、6、6 和 1 株(表 3), 分别占嗜盐古菌所分离菌株的 63.3%、23.3%、4.7%、4.0%、4.0%和 0.7%。在嗜盐细菌中, *Pseudomonas* 属菌株最多, 有 107 株, 依次有 *Halomonas* 属菌株 3 株, *Aliifodinibius* 属菌株 2 株, *Halobacillus* 属菌株 1 株, *Halospina* 属菌株 1 株(表 3), 分别占嗜盐细菌分离菌株的 93.9%、2.6%、1.7%、0.9%和 0.9%。

在嗜盐古菌中,来自于 *Halorubrum* 的菌株数量最多,共有 95 株, 占有所有分离菌株的 36.0%, 占所分离嗜盐古菌总数的 63.3%, 说明盐红菌属(*Halorubrum*)物种为该生境嗜盐古菌的优势物种(图 1)。在所分离的细菌中, *Pseudomonas* 菌株有 107 株, 占总分离菌株数量的 40.5%, 占所分离细菌总数的 93.9%, 说明假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种为该生境的嗜盐细菌的优势物种(图 1)。总体而言,嗜盐古菌盐红菌属(*Halorubrum*)物种和假单胞菌属(*Pseudomonas*)物种是定远盐矿中的优势物种。

## 2.2 不同钻井盐芯样品可培养嗜盐微生物比较

### 2.2.1 25 和 Z24 盐芯样品嗜盐微生物物种组成比较

从 25 和 Z24 盐芯样品中, 分别分离到嗜盐微生物 214 株和 50 株(表 3)。在 25 号盐芯样品中, 有嗜盐古菌 128 株, 嗜盐细菌 86 株; 其中嗜盐古菌隶属于 *Halorubrum*、*Haloterrigena*、*Natrinema*、

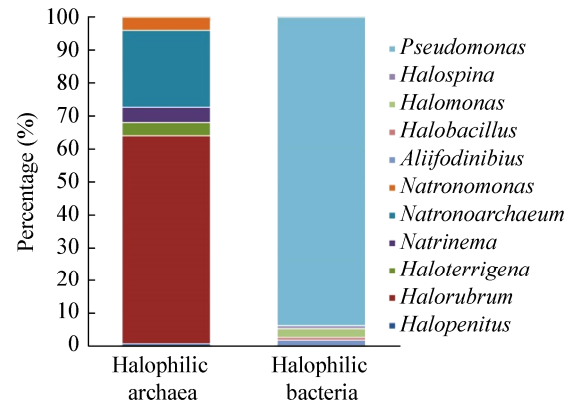


图 1 定远盐矿样品可培养嗜盐微生物总体组成(属级水平)

Figure 1 Culturable halophiles in Dingyuan salt mine (genus level)

注: 不同颜色代表不同属嗜盐微生物, 柱高代表该属占比。

Note: Different color represents different genera of halophilic microorganisms. Height of the column represents the proportion of this genus.

*Natronoarchaeum* 和 *Natronomonas* 5 个属; 细菌隶属于 *Aliifodinibius*、*Halobacillus*、*Halomonas*、*Halospina* 和 *Pseudomonas* 5 个属。Z24 盐芯样品中, 有嗜盐古菌 22 株, 细菌 28 株; 其中嗜盐古菌属于 *Halorubrum*、*Haloterrigena*、*Natrinema* 和 *Natronoarchaeum* 4 个属, 细菌隶属于 *Halomonas* 和 *Pseudomonas* 2 个属。从属级水平上看, 两个钻井的嗜盐微生物组成较为相似, 25 号盐芯样品完全覆盖了 Z24 样品所揭示的嗜盐微生物类群。

从样品 25 分离得到的嗜盐古菌中, *Halorubrum* 属有 80 株, *Natronoarchaeum* 属 30 株, *Haloterrigena* 属 6 株, *Natrinema* 属 6 株, *Natronomonas* 属 6 株, 分别占所分离可培养嗜盐古菌总数的 62.5%、23.4%、4.7%、4.7%和 4.7%; 在所分离可培养嗜盐细菌中, 分布情况为 *Pseudomonas* 属 80 株, *Aliifodinibius* 属 2 株, *Halomonas* 属 2 株, *Halobacillus* 属 1 株, *Halospina* 属 1 株, 分别占嗜盐细菌分离菌株的 93.0%、2.3%、2.3%、1.2%和 1.2%。从定远 Z24 盐矿所分离得到的嗜盐古菌中, *Halorubrum* 属有 15 株, *Natronoarchaeum* 属有 5 株,

*Natrinema* 属仅有 1 株, *Halopenitus* 属也仅有 1 株, 分别占所分离可培养嗜盐古菌总数的 68.2%、22.7%、4.5%和 4.5%; 所分离可培养嗜盐细菌中, 属于 *Pseudomonas* 的菌株有 27 株, 属于 *Halomonas* 的菌株仅有 1 株, 分别占嗜盐细菌分离菌株的 96.4%和 3.6%。

### 2.2.2 25 和 Z24 盐芯样品嗜盐微生物优势物种分析

在样品 25 所分离得到的可培养嗜盐古菌中, *Halorubrum* 属菌株 80 株, 占总数的 37.4%, 占所分离嗜盐古菌的 62.5%, 因此该生境中嗜盐古菌的优势物种为 *Halorubrum* 属菌株; 嗜盐细菌中, *Pseudomonas* 属的菌株有 80 株, 占 25 样品所分离总数的 37.4%, 占嗜盐细菌的 93.0%, 因此嗜盐细菌中的优势物种为 *Pseudomonas* 属菌株(图 2)。样品 Z24 所分离得到的古菌中, 优势物种为 *Halorubrum* 属菌株有 15 株, 占 Z24 样品所分离可培养嗜盐菌总数的 30.0%, 占嗜盐古菌的 68.2%; 嗜盐细菌中, *Pseudomonas* 属菌株有 27 株, 占总数的 54.0%, 占细菌中的 96.4%, 是细菌中的优势物种(图 2)。研究结果显示, 在属级水平上, 25 和 Z24 盐芯样品中优势类群相同, 可培养嗜盐古菌均

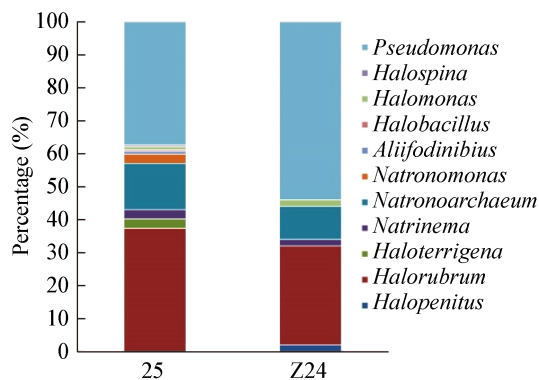


图 2 定远盐矿样品 25 和 Z24 可培养嗜盐微生物组成比较(属级水平)

Figure 2 Comparison of culturable halophiles between samples 25 and Z24 on genus level

注: 不同颜色代表不同属嗜盐微生物, 柱高代表该属占比。

Note: Different colors represent different genera of halophilic microorganisms. Height of column represents proportion of genus.

以 *Halorubrum* 属菌株为主, 可培养嗜盐细菌均以 *Pseudomonas* 属菌株为主。

### 2.3 不同埋深可培养嗜盐微生物比较

#### 2.3.1 不同埋深的盐芯样品嗜盐微生物物种组成比较

Z24 钻井盐芯样品 Z24-3 和 Z24-8 分别代表不同的埋深(表 1)。对 Z24 盐矿所分离的可培养嗜盐微生物根据埋深不同进行整理, 发现从 Z24-8 中共分离到嗜盐微生物 46 株(嗜盐古菌 18 株, 细菌 28 株), 而从 Z24-3 中仅分离到 4 株(均为嗜盐古菌)(表 3)。

#### 2.3.2 不同埋深的盐芯样品嗜盐微生物优势物种分析

在样品 Z24-3 所分离的 4 株可培养嗜盐古菌中, *Natronoarchaeum* 属菌株有 3 株, 占总数的 75.0%, 因此古菌中的优势物种为 *Natronoarchaeum* 属菌株(图 3)。Z24-8 盐矿样品所分离测定得到的古菌中, *Halorubrum* 属菌株有 15 株, 占 Z24 样品所分离可培养嗜盐菌总数的 32.6%, 占古菌的 83.3%, 远远高于其他古菌属的菌株数量比例, 因此古菌中的优势属为 *Halorubrum*; 嗜盐细菌中, *Pseudomonas* 属菌株有 27 株, 占 Z24 样品所分离可培养嗜盐菌

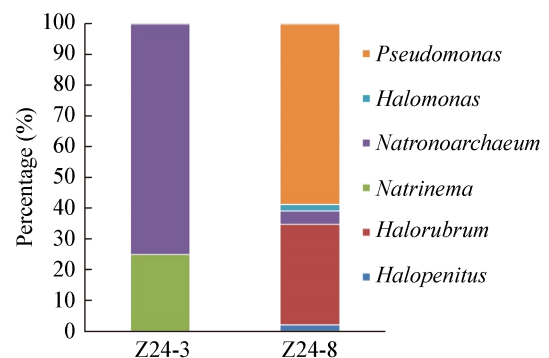


图 3 Z24 盐芯样品不同深度嗜盐微生物组成(属级水平)

Figure 3 Components of culturable halophiles along with different buried depth of Z24 salt core sample (genus level)

注: 不同颜色代表不同属嗜盐微生物, 柱高代表该属占比。

Note: Different colors represent different genera of halophilic microorganisms. Height of column represents the proportion of genus.



总数的 58.7%，占嗜盐细菌中的 96.4%，因此 *Pseudomonas* 为嗜盐细菌中的优势属(图 3)。

## 2.4 定远盐矿样品可培养嗜盐微生物物种多样性分析

### 2.4.1 25 和 Z24 盐芯可培养嗜盐微生物物种多样性比较

对 25 和 Z24 两个钻井的盐芯样品所分离的可培养嗜盐微生物，以基于 16S rRNA 基因序列相似性比较所揭示的物种为基础，进行物种多样性比较，如表 4 所示。样品 25 总体的香农指数为 3.2，辛普森指数 0.8；嗜盐古菌类群的香农指数为 3.3，辛普森指数为 0.9；嗜盐细菌类群的香农指数为 0.5，辛普森指数为 0.1。Z24 盐芯样品总体的香农指数为 2.2，辛普森指数为 0.7；嗜盐古菌的香农指数为 2.5，辛普森指数为 0.8；嗜盐细菌的香农指数为 0.2，辛普森指数为 0.1(表 4)。因此，无论在总体上、嗜盐古菌还是嗜盐细菌方面，25 样品中的物种多样性均略高于 Z24 样品。此外，在所采样品总体中，分离所得的嗜盐古菌的物种多样性要高于嗜盐细菌。

### 2.4.2 定远盐矿不同埋深可培养嗜盐微生物物种多样性分析

对定远盐矿样品 Z24 中的两种不同深度的盐芯样品(Z24-3 和 Z24-8)所分离的可培养嗜盐微生物的物种多样性进行比较分析。如表 5 所示，样品 Z24-8 的总体、嗜盐古菌和嗜盐细菌的香农指数分别为 2.0、2.2 和 0.2；辛普森指数分别为 0.5、0.3 和 0.1；而样品 Z24-3 的总体、嗜盐古菌和嗜盐细菌的香农指数分别为 0.8、0.8 和 0，辛普森指数分别为 0.4、0.4 和 0。结果显示，Z24-8(埋深：305–310 m)

表 4 样品 25 和 Z24 可培养嗜盐菌物种多样性比较

Table 4 Species diversity of culturable halophiles in samples 25 and Z24

多样性指数 Diversity index	总体 General index		嗜盐古菌 Halophilic archaea		嗜盐细菌 Halophilic bacteria	
	25	Z24	25	Z24	25	Z24
Shannon index	3.166 5	2.204	3.333 6	2.477 2	0.498 9	0.222 3
Simpson index	0.814 4	0.664	0.872 4	0.772 7	0.133 3	0.068 9

表 5 Z24 盐芯样品不同深度嗜盐微生物多样性分析

Table 5 Species diversity of cultivable halophiles in Z24 along with the different buried depths

多样性指数 Diversity index	总体 General index		嗜盐古菌 Halophilic archaea		嗜盐细菌 Halophilic bacteria	
	Z24-3	Z24-8	Z24-3	Z24-8	Z24-3	Z24-8
Shannon index	0.811 3	1.958 5	0.811 3	2.191 6	0	0.222 3
Simpson index	0.375 0	0.546 3	0.375 0	0.290 1	0	0.068 9

的物种多样性高于 Z24-3(埋深：381–385 m)，且 Z24-3 样品中没有分离到嗜盐细菌，嗜盐古菌物种也较少，只有两个属物种分布，物种分布较单一。

从 Z24 盐芯样品所揭示的物种多样性和埋深的关系看，盐芯样品中的微生物物种多样性显示随着深度的增加而降低的趋势。

## 2.5 表型特征

### 2.5.1 菌落形态特征

从所分离得到的 264 株菌中选取 21 株代表菌株进行纯培养物培养，每 1 株菌代表 1 个菌种，其中嗜盐古菌 17 株，嗜盐细菌 4 株。观察所选取代表菌株的菌落形态特征，结果如表 6 所示。所有嗜盐菌的菌落形态均为圆形，均易挑起，均凸出培养基表面。颜色有所不同，嗜盐古菌有红、橘红、粉红、淡红四种类型，嗜盐细菌除 LN124 菌落为白色外，其余均为淡黄色。嗜盐古菌菌落大多数透明，少数不透明；嗜盐细菌菌落均不透明。

### 2.5.2 菌株显微特征

对所选取菌株的纯化物进行革兰氏染色及显微形态的观察，结果如表 6 所示。其中 17 株嗜盐古菌均为革兰氏阴性菌；4 株嗜盐细菌中有 1 株为革兰氏阳性菌，3 株为革兰氏阴性菌。嗜盐古菌菌株显微形态均为多形，大小不一致。嗜盐细菌菌株显微形态均为杆状，大小也不一致。

## 2.6 生理生化特征

### 2.6.1 生长 NaCl 浓度范围及最适 NaCl 浓度

嗜盐古菌的生长盐浓度范围多数为 1.4–5.0 mol/L，最适生长盐浓度多数为 3.4 mol/L，部分为 2.5 mol/L 或 4.3 mol/L。嗜盐细菌的可生长盐浓度范围较嗜



表 6 菌株表型特征及耐盐度

Table 6 Phenotype and salinity requirement

菌株 Strains	最近物种 The closest species	菌落特征 Colony characteristics					细胞形态 Cell morphology		耐盐度 Salty tolerance		
		大小 Size (mm)	颜色 Color	透明度 Transparence	易挑起 与否 Easily picked or not	凸起 与否 Convex or not	革兰氏 染色 Gram-stain	形状 Shape	大小 Size (μm)	范围 Range (mol/L)	最适 Optimum (mol/L)
LN27	<i>Halorubrum aidingense</i> 31-hong <sup>T</sup>	1.0	橘红色 Orange	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.4-0.6× 1.0-1.2	2.5-4.3	2.5
LN189	<i>Halorubrum aquaticum</i> EN-2 <sup>T</sup>	1.5	橘红色 Orange	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.3-0.5× 1.0-1.3	1.4-5.0	3.4
LN145	<i>Halorubrum arcis</i> AJ201 <sup>T</sup>	1.2	红色 Red	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.3-0.4× 0.8-1.0	2.5-5.0	3.4
LN187	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	2.0	红色 Red	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.4-0.6× 0.9-1.1	2.5-5.0	4.3
LN59	<i>Halorubrum chaoviator</i> Halo-G <sup>T</sup>	1.5	橘红色 Orange	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.5-0.8× 1.4-1.6	2.5-5.0	4.3
LN74	<i>Halorubrum halophilum</i> B8 <sup>T</sup>	1.5	红色 Red	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.5-0.7× 1.3-1.5	2.5-5.0	4.3
LN226	<i>Halorubrum kocurii</i> JCM 14978 <sup>T</sup>	1.1	橘红色 Orange	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.5-0.7× 1.3-1.4	2.5-5.0	4.3
LN213	<i>Halorubrum lipolyticum</i> 9-3 <sup>T</sup>	1.0	橘红色 Orange	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.3-0.5× 1.1-1.3	2.5-5.0	4.3
LN58	<i>Halorubrum persicum</i> C49 <sup>T</sup>	1.2	红色 Red	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.5-0.8× 1.6-1.8	2.5-5.0	3.4
LN137	<i>Halorubrum trueperi</i> Y73 <sup>T</sup>	1.5	橘红色 Orange	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.4-0.6× 1.0-1.1	2.5-5.0	3.4
LN110	<i>Halorubrum yunnanense</i> Q85 <sup>T</sup>	1.0	粉红色 Pink	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.4-0.6× 1.2-1.4	1.7-5.0	3.4
LN16	<i>Haloterrigena jeotgali</i> A29 <sup>T</sup>	2.2	粉红色 Pink	-	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.4-0.6× 1.2-1.5	1.7-5.0	3.4
LN243	<i>Haloterrigena saccharevitans</i> AB14 <sup>T</sup>	1.1	橘红色 Orange	-	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.6-0.9× 1.0-1.1	2.5-5.0	3.4
LN10	<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM 15624 <sup>T</sup>	0.8	粉红色 Pink	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.3-0.5× 1.0-1.2	2.5-5.0	3.4
LN108	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 <sup>T</sup>	0.7	淡红色 Light red	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.6-0.8× 1.1-1.3	1.4-5.0	2.5
LN121	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160 <sup>T</sup>	0.2	橘红色 Orange	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.6-0.8× 1.0-1.6	2.5-5.0	4.3
LN185	<i>Halopenitus malekzadehii</i> CC65 <sup>T</sup>	1.0	橘红色 Orange	+	+	+	-	多形 Pleomorphic	0.5-0.8× 1.0-1.5	1.4-5.0	3.4
LN97	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 <sup>T</sup>	1.0	淡黄色 Light yellow	-	+	+	-	短杆状 Rod	0.4-0.5× 1.3-3.83	1.7-4.3	2.5
LN124	<i>Halomonas gudaonensis</i> SL014B-69 <sup>T</sup>	5.0	白色 White	-	+	+	-	短杆状 Rod	0.3-0.4× 1.6-10.5	0.2-3.4	1.7
LN84	<i>Halobacillus dabanensis</i> D-8 <sup>T</sup>	1.1	淡黄色 Light yellow	-	+	+	+	短杆状 Rod	0.4-0.5× 1.3-3.83	0.1-4.3	1.4
LN246	<i>Halospina denitrificans</i> HGD 1-3 <sup>T</sup>	1.2	淡黄色 Light yellow	-	+	+	-	短杆状 Rod	0.4-0.5× 1.1-5.0	1.4-3.4	1.4

注: +: 阳性; -: 阴性.

Note: +: Positive; -: Negative.

盐古菌大。嗜盐古菌在低于 1.4 mol/L 的 NaCl 浓度条件大多不能生长,而嗜盐细菌 LN124 和 LN84 分别能在 0.2 mol/L 和 0.1 mol/L 的 NaCl 浓度条件下生长(表 6)。

### 2.6.2 产酶特性

在所选取的 21 个代表菌株(嗜盐古菌 17 株,嗜盐细菌 4 株)中,产胞外蛋白酶菌株 1 株,酯酶 1 株,淀粉酶 2 株,明胶酶 2 株,氧化酶 3 株,触酶 20 株(表 7)。17 株嗜盐古菌均没有胞外蛋白酶活性,均具有触酶活性。嗜盐古菌 LN137 菌株具有胞外酯酶、淀粉酶、明胶酶活性。嗜盐细菌中 LN124 具有蛋白酶、淀粉酶、明胶酶活性。

## 3 讨论与结论

安徽定远盐矿位于安徽省定远县东兴乡,其含盐层厚度约 150 m,系河湖相沉积,以盐湖相和淡水湖泊相为主<sup>[19]</sup>。在定远盐矿的含盐层中发现轮藻、腹足类化石,此外还含有丰富的孢粉。根据孢粉组合,确定含盐岩系时代为早第三纪晚古新世——渐

新世,距今约 3 650 万年前<sup>[20]</sup>。我们通过纯培养研究,从定远盐矿中分离到 *Halorubrum*、*Halopenitus*、*Haloterrigena*、*Natrinema*、*Natronoarchaeum* 和 *Natronomonas* 等 6 个属的嗜盐古菌物种及 *Pseudomonas*、*Halobacillus*、*Halomonas*、*Halospina* 和 *Aliifodinibius* 等 5 个属的嗜盐细菌物种。

在安徽定远盐矿发现的 *Natrinema*、*Natronoarchaeum* 和 *Natronomonas* 等嗜盐古菌菌株在云南盐矿中较为少见;而在云南盐矿中发现的 *Haloarcula*、*Haloferax*、*Halogramum*、*Halomicrobium*、*Halobacterium* 和 *Natronococcus* 等属菌株在本研究中未分离到。在嗜盐细菌方面,安徽定远盐矿分离到的 *Pseudomonas*、*Halobacillus* 和 *Halospina* 等属菌株在云南盐矿中却较为少见,而在云南盐矿中发现的 *Erythrobacter*、*Pelobacter*、*Desulfuromusa*、*Desulfovibrio*、*Anaerophaga*、*Halovibrio*、*Halanaerobium*、*Methylohalomonas*、*Sediminimonas*、*Thiohalorhabdus* 等属菌株在本研

表 7 胞外酶活测定

Table 7 Detection of extracellular enzyme activity

菌株 Strain	亲缘最近物种 The closest species	蛋白酶 Protease	酯酶 Esterase	淀粉酶 Amylase	明胶酶 Gelatinase	氧化酶 Oxidase	触酶 Catalase
LN27	<i>Halorubrum aidingense</i> 31-hong <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN189	<i>Halorubrum aquaticum</i> EN-2 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN145	<i>Halorubrum arcis</i> AJ201 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN187	<i>Halorubrum californiense</i> SF3 213 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN59	<i>Halorubrum chaoviator</i> Halo-G <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN74	<i>Halorubrum halophilum</i> B8 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN226	<i>Halorubrum kocurii</i> JCM 14978 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN213	<i>Halorubrum lipolyticum</i> 9-3 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN58	<i>Halorubrum persicum</i> C49 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN137	<i>Halorubrum trueperi</i> Y73 <sup>T</sup>	-	+	+	+	-	+
LN110	<i>Halorubrum yunnanense</i> Q85 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN16	<i>Haloterrigena jeotgali</i> A29 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN243	<i>Haloterrigena saccharevitans</i> AB14 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN10	<i>Natrinema pellirubrum</i> DSM 15624 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN108	<i>Natronomonas moolapensis</i> 8.8.11 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN121	<i>Natronomonas pharaonis</i> DSM 2160 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN185	<i>Halopenitus malekzadehii</i> CC65 <sup>T</sup>	-	-	-	-	-	+
LN97	<i>Pseudomonas halophila</i> DSM 3050 <sup>T</sup>	-	-	-	-	+	-
LN124	<i>Halomonas gudaonensis</i> SL014B-69 <sup>T</sup>	+	-	+	+	-	+
LN84	<i>Halobacillus dabanensis</i> D-8 <sup>T</sup>	-	-	-	-	+	+
LN246	<i>Halospina denitrificans</i> HGD 1-3 <sup>T</sup>	-	-	-	-	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

究中未分离到<sup>[17]</sup>。这表明不同盐矿由于沉积方式、地理位置、地势构造、理化性质及地质历史等的不同,形成了各自独特的微生物组成结构。安徽定远盐矿自形成后盐层相对稳定,虽然云南盐矿的形成历史与安徽定远盐矿类似,但中间经历数次海侵事件,这可能造成它们在物种分布上的巨大差异。

本研究安徽定远盐矿所分离的嗜盐古菌中,*Halorubrum* 属菌株有 95 株,为该生境嗜盐古菌的优势属,这与 2006 年田新朋等对云南盐矿的研究的结果类似<sup>[15]</sup>。此外,在其他高盐环境中也发现 *Halorubrum* 属菌株为优势物种<sup>[14,29]</sup>。说明该属菌株对高盐环境具有较强的适应能力,可能正在经历物种的快速扩张期。据报道 *Halorubrum* 属菌株对环境盐浓度有较大的适应范围,并能形成生物膜以抵御各种不利环境,或通过快速改变基因组的方式来适应变化的环境条件<sup>[30-32]</sup>。

在所分离的嗜盐细菌方面,*Pseudomonas* 属物种为安徽定远盐矿嗜盐细菌的优势物种,在云南盐矿中尽管也发现有 *Pseudomonas* 属物种存在,但丰度很低,并非是优势物种<sup>[17]</sup>。在肖炜和陈义光等对云南盐矿可培养细菌的研究中,显示 *Bacillus* 属菌株占该生境的优势地位<sup>[33-34]</sup>,这说明 *Pseudomonas* 属物种并非在各种盐矿生境中均能取得优势地位,而在定远盐矿的优势地位可能由于其具有比该生境中其他属细菌更强的耐盐性。根据本研究结果,*Pseudomonas* 属物种较其他属的细菌具有更强的耐盐性,能在 1.7-4.3 mol/L 盐浓度条件下生存。

本研究从定远盐矿中分离到 *Halorubrum* 属和 *Pseudomonas* 属菌株数目分别为 95 个和 107 个,16S rRNA 基因相似性分析结果识别的物种数分别为 11 个和 1 个(可操作分类单元个数也分别为 11 和 1)。*Halorubrum* 属拥有大量物种说明在固相盐矿生境中,物种间形成实际的隔离,基因交流被阻断,能够促进物种形成。此外,大量的物种分布还说明 *Halorubrum* 属物种可能正经历快速扩张期和物种形成期,即 *Halorubrum* 属物种在此环境条件下可

能正在经历剧烈演变,这时其基因组改变的速度较快<sup>[32]</sup>,演化出新物种的可能性较大。相反,同在此生境中,仅识别出 1 个 *Pseudomonas* 属物种 (*Pseudomonas halophila*),所得到的众多不同菌株的 16S rRNA 基因序列几乎没有发生变异,说明 *Pseudomonas* 属物种正处在一个物种稳定期。而该物种成为该生境的优势物种,说明它占据了有利生态位,物种对环境的适应、环境对物种的塑造已经基本达到平衡,演化出新物种可能性较小。

致谢:感谢安徽师范大学生命科学学院刘柳和吕金亭在实验方面给予的帮助。

## REFERENCES

- [1] He KS, Sui GH. Extremophilic microorganisms's research and its application[J]. Guangdong Chemical Industry, 2009, 36(7): 109-111,118 (in Chinese)  
何康生, 眭光华. 极端微生物的研究及其应用[J]. 广东化工, 2009, 36(7): 109-111,118
- [2] Tang YH, Cao Y, Lu CY, et al. Research progress of the active metabolites of special eco-environment microorganisms[J]. Microbiology China, 2006, 33(4): 163-166 (in Chinese)  
唐永红, 曹庸, 卢成璞, 等. 特殊生境微生物及其活性代谢产物研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 163-166
- [3] Dong XW, Xue CM, Wu YD. The progress of extremophilic microorganisms and their adaptive mechanism[J]. Journal of Microbiology, 2005, 25(1): 74-77 (in Chinese)  
董锡文, 薛春梅, 吴玉德. 极端微生物及其适应机理的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2005, 25(1): 74-77
- [4] Xie Y. Diversity of halophilic bacteria in YanJing hot salt well[D]. Kunming: Master's Thesis of Kunming University of Science and Technology, 2007 (in Chinese)  
谢莹. 盐井嗜盐菌多样性的初步研究[D]. 昆明: 昆明理工大学硕士学位论文, 2007
- [5] Shen LL, Han Z, Wen HY, et al. Cloning of 16S rDNA sequence and phylogenetic analysis of halophilic strain LYG86[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2010(6): 39-41 (in Chinese)  
沈露露, 韩征, 温洪宇, 等. 嗜盐菌株 LYG86 16S rDNA 序列克隆及系统发育学分析[J]. 江苏农业科学, 2010(6): 39-41
- [6] He MY, Zou ZZ, Cai L, et al. Polymorphic halophilic bacteria and haloarchaea from Lianyungang Taibei and Yancheng Sanwei salt field soils[J]. Microbiology China, 2008, 35(5): 737-742 (in Chinese)  
何敏艳, 邹正中, 蔡林, 等. 连云港台北和盐城三圩盐田土壤嗜盐菌多样性研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(5): 737-742
- [7] Xu Y, Zhou PJ, Tian XY. Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronorubrum bangense* gen. nov., sp. nov. and *Natronorubrum tibetense* gen. nov., sp. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49:

- 261-266
- [8] Han J, Wu LP, Liu XB, et al. Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers[J]. *Biomaterials*, 2017, 139: 172-186
- [9] Xue Q, Liu XB, Lao YH, et al. Anti-infective biomaterials with surface-decorated tachyplestin I[J]. *Biomaterials*, 2018, 178: 351-362
- [10] Fan HP, Xue YF, Zeng Y, et al. Archaeal diversity of Zabuye Lake in Tibet analyzed by culture-independent approach[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(4): 401-408 (in Chinese)  
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[J]. *微生物学报*, 2003, 43(4): 401-408
- [11] Chai LH, Cui XL, Peng Q, et al. Bacterial diversity of two salt lakes in Qinghai[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(3): 271-275 (in Chinese)  
柴丽红, 崔晓龙, 彭谦, 等. 青海两盐湖细菌多样性研究[J]. *微生物学报*, 2004, 44(3): 271-275
- [12] 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
- [13] Pan HL, Zhou C, Wang HL, et al. Diversity of halophilic archaea in hypersaline lakes of Inner Mongolia, China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(1): 1-6 (in Chinese)  
潘海莲, 周成, 王红蕾, 等. 内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性的研究[J]. *微生物学报*, 2006, 46(1): 1-6
- [14] Naghoni A, Emiazzi G, Amoozgar MA, et al. Microbial diversity in the hypersaline Lake Meyghan, Iran[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11522
- [15] Tian XP, Zhang YQ, Tang SK, et al. Culture-dependent extremely halophilic archaea isolated from Heijing Ancient Salt Mine, Yunnan[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(6): 1-7 (in Chinese)  
田新朋, 张玉琴, 唐蜀昆, 等. 云南黑井古盐矿可培养极端嗜盐古菌初步研究[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(6): 1-7
- [16] Gramain A, Diaz GC, Demergasso C, et al. Archaeal diversity along a subterranean salt core from the Salar Grande (Chile)[J]. *Environmental Microbiology*, 2011, 13(8): 2105-2121
- [17] Xiao W, Wang ZG, Wang YX, et al. Comparative molecular analysis of the prokaryotic diversity of two salt mine soils in Southwest China[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53(11): 942-952
- [18] Chen S, Liu HC, Zhao D, et al. *Halorubrum yunnanense* sp. nov., isolated from a subterranean salt mine[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(12): 4526-4532
- [19] Liu Q, Zhu K. Study on the deposition characteristic of the salt-bearing series and the ore deposit origin of the Balizhang gypsum mining areas, Dingyuan County, Anhui[J]. *Geological Survey and Research*, 2007, 30(2): 115-120 (in Chinese)  
刘青, 朱琨. 安徽定远县八里张石膏矿区含盐岩系沉积特征与矿床成因探讨[J]. *地质调查与研究*, 2007, 30(2): 115-120
- [20] Lu YB, Wang D, Zhou HY. Sedimentary facies and genetic analysis of the eogene saline formation, Dingyuan, Anhui[J]. *Geology of Anhui*, 1991, 1(1): 43-53,84 (in Chinese)  
陆彦邦, 王栋, 周海渊. 安徽定远早第三纪含盐岩系的沉积相及岩盐成因分析[J]. *安徽地质*, 1991, 1(1): 43-53,84
- [21] Li Y, Xiang H, Liu JF, et al. Purification and biological characterization of halocin C8, a novel peptide antibiotic from *Halobacterium* strain AS7092[J]. *Extremophiles*, 2003, 7(5): 401-407
- [22] Dussault HP. An improved technique for staining red halophilic bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1955, 70(4): 484-485
- [23] Oren A, Ventosa A, Grant WD. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*[J]. *International Journal of System Bacteriology*, 1997, 47(1): 233-238
- [24] Gutiérrez C, González C. Method for simultaneous detection of proteinase and esterase activities in extremely halophilic bacteria[J]. *Applied Microbiology*, 1972, 24(3): 516-517
- [25] Cui HL, Zhou PJ, Oren A, et al. Intraspecific polymorphism of 16S rRNA genes in two halophilic archaeal genera, *Haloarcula* and *Halomicrobium*[J]. *Extremophiles*, 2009, 13(1): 31-37
- [26] Zhao WY. Microbial diversity in the hypersaline Dabuxun Lake in Qaidam Basin, China[D]. Beijing: Master's Thesis of China University of Geosciences (Beijing), 2013 (in Chinese)  
赵婉雨. 柴达木盆地达布逊湖微生物多样性研究[D]. 北京: 中国地质大学(北京)硕士学位论文, 2013
- [27] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98
- [28] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613-1617
- [29] Xue MY, Yin TT, Ding LY, et al. Diversity research on halophilic archaea of Taibei saltern in Lianyungang[J]. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 2013(9): 91-93 (in Chinese)  
薛梦颖, 殷婷婷, 丁丽燕, 等. 连云港台北盐场嗜盐古菌多样性研究[J]. *黑龙江农业科学*, 2013(9): 91-93
- [30] Liao Y, Williams TJ, Ye J, et al. Morphological and proteomic analysis of biofilms from the Antarctic archaeon, *Halorubrum lacusprofundi*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37454
- [31] Mohan NR, Fullmer MS, Makkay AM, et al. Evidence from phylogenetic and genome fingerprinting analyses suggests rapidly changing variation in *Halorubrum* and *Haloarcula* populations[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 143
- [32] Papke RT, Koenig JE, Rodriguez-Valera F, et al. Frequent recombination in a saltern population of *Halorubrum*[J]. *Science*, 2004, 306(5703): 1928-1929
- [33] Xiao W, Yang YL, Liu HW, et al. Culturable bacterial diversity of the ancient salt deposits in the Kunming Salt Mine, P. R. China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(6): 967-972 (in Chinese)  
肖炜, 杨亚玲, 刘宏伟, 等. 昆明盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌多样性研究[J]. *微生物学报*, 2006, 46(6): 967-972
- [34] Chen YG, Li HM, Li QY, et al. Phylogenetic diversity of culturable bacteria in the ancient salt deposits of the Yipinglang Salt Mine, P. R. China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(4): 571-577 (in Chinese)  
陈义光, 李汇明, 李沁元, 等. 一平浪盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌的系统发育多样性研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(4): 571-577