

• 研究简报 •

新疆艾比湖和伊吾湖可培养嗜盐古菌多样性

许学伟¹ 吴 敏^{1*} 迪丽拜尔·托乎提² 古丽巴哈尔·阿巴拜克利²¹ (浙江大学生命科学院, 杭州 310058)² (新疆师范大学生命与环境科学学院生物系, 乌鲁木齐 830054)

摘要: 新疆地区盐湖密布, 蕴藏着丰富的微生物资源。为保护和利用微生物物种与基因资源, 作者从新疆准噶尔盆地的艾比湖和天山山间盆地的伊吾湖分离纯化嗜盐微生物。采用PCR方法扩增其中65株嗜盐古菌16S rRNA基因序列。序列分析表明, 分离的嗜盐古菌分属6个属, 艾比湖以*Haloterrigena*和*Natrinema*属的菌株为主, 伊吾湖由*Haloarcula*和*Halorubrum*两个属的菌株构成。通过多样性指数、丰富度指数、均匀度指数和物种相对多度模型对分离的菌株进行多样性分析和比较, 结果表明, 盐湖嗜盐古菌的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数具有一定相关性, 艾比湖可培养嗜盐古菌的多样性高于伊吾湖。研究发现了一些新的物种资源, 表明新疆盐湖中孕育的特色微生物资源亟待保护与利用。

关键词: 盐湖, 嗜盐古菌, 16S rRNA基因, 多样性

Halophilic archaea diversity of Aibi Lake and Yiwu Lake in Xinjiang

Xuewei Xu¹, Min Wu^{1*}, Tohty Dilbar², Ababaikeli Gulibahaer²¹ College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058² College of Life and Environment Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054

Abstract: The diversity of halophilic microorganisms from two different hypersaline environments was analyzed and compared by the polymerase chain reaction (PCR)-based molecular technique and cultivation approaches. The samples were collected from Aibi Lake located in Zhungeer Basin and Yiwu Lake in Tianshan Basin, Xinjiang, respectively. Under aerobic culture conditions, novel halophiles were isolated. 16S rRNA gene sequences of 65 isolates were amplified and determined. The results revealed that all sequences belonged to six genera grouped within the Halobacteriaceae. Most of the 16S rRNA gene sequences related to the genera *Haloterrigena* and *Natrinema* were detected in Aibi Lake samples. In contrast, sequences related to the genera *Haloarcula* and *Halorubrum* were obtained from Yiwu Lake samples. In addition, the isolates' diversities were analyzed and compared using different diversity indices, richness indices, evenness indices, and species abundance models. There were certain correlations among these indices, and they indicated that halophilic archaea diversity of Aibi Lake is higher than that of Yiwu Lake. The discovery of novel species, in a relatively small number of sites from two representative salt lakes, indicated that there are many microbial resources in Xinjiang region that should be protected and utilized.

Key words: salt lake, halophilic archaea, 16S rRNA gene, diversity

盐湖是湖泊的特殊类型, 其湖水矿化度一般高于50 g/L(郑喜玉, 2002)。高盐浓度抑制了多数微生物的生长, 却是嗜盐菌生存的必要条件(Oren, 2002)。目前发现的极端嗜盐菌均为古菌, 其最低生长盐浓度一般为1.5 M, 盐湖中往往蕴藏着这类微

生物资源。

由于受到地理条件、气候因素和人类活动等的综合影响, 盐湖在演化过程中处于运动和变化状态。新疆地区盐湖数量众多, 但由于地处内陆干旱一半干旱区, 许多盐湖的湖水不断蒸发浓缩, 正逐

收稿日期: 2006-02-28; 接受日期: 2006-05-15

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2004CB719604-3)和中国博士后科学基金(2005038636)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: wumin@cls.zju.edu.cn

步演化为无湖表卤水的干盐湖,导致大量嗜盐古菌物种资源渐趋消失。通过对新疆地区具有地域代表性盐湖的嗜盐古菌物种多样性调查,可系统保护和有效利用微生物物种和基因资源,并利于今后研究微生物物种和基因多样性演化机制。

针对大量亟待保护和利用的盐湖嗜盐古菌,我们选择位于准噶尔盆地的艾比湖和天山山间盆地的伊吾湖,研究新疆不同地区、不同演化时期盐湖中可培养嗜盐古菌群落多样性差异。

1 材料和方法

1.1 样品的采集和处理

艾比湖地处新疆西部,位于博尔塔拉蒙古自治州精河县,82°35′–83°16′E, 44°05′–45°08′N,湖面海拔189 m;伊吾湖地处新疆东部,位于哈密地区伊吾县,94°06′–94°20′E, 43°18′–43°23′N,湖面海拔1,890 m(郑喜玉, 2002)。它们分别属于新疆西部盆地和新疆东部高原的代表性盐湖。

于2003年9月和2004年6月分别从艾比湖和伊吾湖采集水样和土样。样品采集后放于4℃暗处保存,运抵实验室后,立即分离嗜盐微生物。两湖湖表卤水主要化学成分见表1。

1.2 菌株的分离和保藏

菌种分离采用牛奶一盐培养基、DSMZ Medium 97、DSMZ Medium 823、HM(Ventosa *et al.*, 1982)、CM(Sehgal & Gibbons, 1960)和OS培养基(Oesterhelt & Stoeckenius, 1974)。土样用相应液体培养基悬浮后梯度稀释涂布平板。水样经0.45 μm和0.22 μm滤膜过滤,滤膜加入液体培养基震荡均匀后,梯度稀释涂布平板。37℃光照培养5–14 d,经反复划线纯化,直至获得单菌落。菌株采用液体石蜡法4℃和甘油管法–80℃长期保藏。

1.3 基因组总DNA的提取

采用本实验室常用的嗜盐古菌DNA少量快速提取方法。新鲜菌体加400 μL无菌水破细胞,70℃处

理10 min。

1.4 16S rRNA基因序列的扩增与鉴定

PCR扩增引物为22F(5'-ATTCCGGTTGATCC-TGC-3')和1540R(5'-AGGAGGTGATCCAGCCGC-AG-3')(Xu *et al.*, 2005)。PCR采用50 μL体系,加入50 ng DNA模板,30个循环。反应条件为:变性94℃, 45 s;退火50℃, 75 s;延伸72℃, 60 s。扩增的PCR产物送上海生物芯片/沪晶公司纯化并进行DNA序列测定,测序引物为22F,测定的序列长度大于500 bp。部分序列采用22F、1540R和519F(5'-CAGCMG-CCGCGGTAATAC-3')(Huber *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2005)进行测定,测定后序列长度大于1,300 bp,为16S rRNA基因序列总长的90%以上。

1.5 嗜盐古菌的多样性分析

定义以16S rRNA基因序列相似性低于97%作为不同的操作分类单元(OTU)(McCaig *et al.*, 1999; 戴欣等, 2005)。采用Shannon多样性指数、Margalef丰富度指数、Shannon均匀度指数、Berger-Parker优势度指数和对数级数分布模型多样性指数进行盐湖物种的多样性分析和比较。

2 结果

2.1 嗜盐古菌16S rRNA基因序列分析

利用6种培养基从艾比湖和伊吾湖分离纯化获得嗜盐古菌。采用古菌通用引物,扩增获取了65个菌株的16S rRNA基因序列。序列通过Blastn程序与GenBank已知序列进行比对分析,发现分离菌株分属6个属,其中艾比湖嗜盐古菌以*Haloterrigena*和*Natrinema*属的菌株占优势,而伊吾湖嗜盐古菌则由*Haloarcula*和*Halorubrum*属的菌株组成。具体分析结果见表2。

2.2 嗜盐古菌多样性分析

多样性测定结果表明,新疆艾比湖和伊吾湖分离到的65株嗜盐古菌可分为13个不同分类单元;艾比湖嗜盐古菌多样性指数和丰富度指数均高于伊

表1 艾比湖和伊吾湖湖表卤水主要化学成分(mg/L)

Table 1 Chemical elements content in the brine from Aibi Lake and Yiwu Lake, Xinjiang (mg/L)

	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	CO ₃ ²⁻	HCO ₃ ⁻	Br ⁻
艾比湖 Aibi Lake	35,000	480.04	382.24	4,736.41	38,014.84	40,335.80	10.27	319.10	13.40
伊吾湖 Yiwu Lake	69,362.30	3,382.09	240.24	20,947.24	159,789.04	16,074.30	4.34	915.34	0.23

表2 艾比湖和伊吾湖分离菌株的分布
Table 2 Distribution of different strains within Aibi Lake and Yiwu Lake

种名 Species	艾比湖 Aibi Lake		伊吾湖 Yiwu Lake	
	菌株数目(个) No. of strains	序列相似性 Sequence similarity (%)	菌株数目(个) No. of strains	序列相似性 Sequence similarity (%)
<i>Haloarcula marismortui</i>	0	—	23	98–99
<i>H. argentinensis</i>	0	—	1	98
<i>H. hispanica</i>	1	99	5	98–99
<i>H. lacisalsi</i>	1	98	0	—
<i>Halorubrum xinjiangense</i>	1	99	5	98–99
<i>H. sodomense</i>	0	—	3	98
<i>H. trapanicum</i>	0	—	1	98
<i>Halorubrum</i> sp. nov.	1	96	1	96
<i>Haloterrigena thermotolerans</i>	5	99	0	—
<i>H. saccharevitans</i>	4	98–100	0	—
<i>Haloterrigena</i> sp. nov.	4	96–97	0	—
<i>Natrinema altunense</i>	7	98–99	0	—
<i>Natronrubrum aibiense</i>	2	96–97	0	—
总计 Total	26		39	

表3 嗜盐古菌的多样性测定和多度模型
Table 3 Diversity measurement and abundance model of halophilic archaea

多样性指数 Diversity measure	公式 Formula	艾比湖 Aibi Lake	伊吾湖 Yiwu Lake
多样性指数 Diversity indices			
Shannon 多样性指数 Shannon index (H')	$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$	1.940	1.320
丰富度指数 Richness indices			
Margalef 丰富度指数 Margalef index (D_{Mg})	$D_{Mg} = \frac{(S-1)}{\ln N}$	2.455	1.638
均匀度与优势度指数 Evenness and dominance indices			
Shannon 均匀度指数 Shannon evenness (E)	$E = \frac{H'}{\ln S}$	0.890	0.680
Berger-Parker 优势度指数 Berger-Parker dominance index (d)	$d = \frac{n_{\max}}{N}$	0.269	0.590
物种相对多度模型 (对数级数分布模型) Species abundance model (Log series distribution model)			
对数级数分布多样性指数 Log series distribution index (α)	$S = \alpha \ln(1 + \frac{N}{\alpha})$	4.877	2.487

公式介绍详见文献 (马克平, 1994; 马克平和刘玉明, 1994; Hill *et al.*, 2003)。S 代表样品中的物种数目, N 代表全部个体, n_i 代表属于种 i 的个体数目, P_i 代表属于种 i 的个体在全部个体中的比例
Formula are from references (Ma, 1994; Ma & Liu, 1994; Hill *et al.*, 2003). S, The number of OTUs in the samples; N, The total number of strains in the samples; n_i , The number of strains in the i th OTU; and P_i , The proportion of strains in the i th OTU (estimated using n_i/N).

吾湖, 但这两个盐湖的均匀度指数差异不明显(表 3)。

3 讨论

物种多样性是把物种的数目和个体数目分配状况(丰度和均匀度)结合起来考虑的一个统计量, 它反映了生物群落和生态系统的特征, 例如结构类

型、发展阶段、稳定程度和生境差异等等。Shannon 多样性指数、Margalef 丰富度指数和对数级数分布模型多样性指数 α , 是对稀有物种敏感的指数, 艾比湖嗜盐古菌的这些指数都与伊吾湖具有明显差异。与之相反, Berger-Parker 优势度指数、Shannon 均匀度指数属于对富集种相对敏感的指数, 表现为两个盐湖这些指数彼此间差异性不明显(表 3)。这与

以往的研究结果相一致(Hill *et al.*, 2003)。伊吾湖的Shannon均匀度指数低于艾比湖, 其Berger-Parker优势度指数高于艾比湖(表3)。原因在于伊吾湖优势物种*Haloarcula marismortui*的菌株多达23株, 而艾比湖相对较多的菌株分布在*Natrinema altunense*(7株)、*Haloterrigena thermotolerans*(5株)、*H. saccharevitans*(4株)等物种中。

总体而言, 两个盐湖嗜盐古菌的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数具有一定相关性。在对数级数分布模型不是最好的理论分布时, 其多样性指数 α 也能较好地反映物种的多样性格况, 并且不受样方大小的影响(马克平, 1994), 艾比湖的该指数要明显高于伊吾湖。因此, 综合上述物种多样性评价结果可知, 艾比湖可培养嗜盐古菌的多样性要高于伊吾湖。通过多种方式综合评价物种多样性, 可有效避免单一指数评价的偏颇。

艾比湖与伊吾湖均地处干旱一半干旱区, 湖盆形成于中—新生代, 卤水化学类型为硫酸盐型, 湖内蕴育着微生物群落, 但两者在其他方面的差异, 造就了目前嗜盐古菌菌群组成和多样性的差异。艾比湖年降水量为200–600 mm, 以地表补给水为主, 湖水矿化度较低(112.4 g/L); 伊吾湖年降水量低于100 mm, 附近无常年性地表河流, 主要靠地下水补给, 湖水矿化度达269.91 g/L, 盐湖东部和北部形成沼泽(郑喜玉, 1995, 2002)。相比而言, 伊吾湖在营养、离子浓度方面更适合嗜盐古菌的生长, 部分湖区富营养化形成沼泽, 可能造成优势物种的繁衍, 形成物种多样性降低的格局。艾比湖湖区面积(1,443.7 km²)为伊吾湖(29.27 km²)的近50倍, 受环境影响相对较小, 有利于微生物长期生存。

新疆盐湖密集, 是世界盐湖分布最集中的地区之一(郑喜玉, 2002)。通过两个不同海拔盐湖中可培养嗜盐古菌多样性分析, 发现了一些新的物种资源。加上已经从伊吾湖分离和鉴定的嗜盐古菌新物种*H. saccharevitans*(Xu *et al.*, 2005), 表明新疆盐湖蕴藏着特色嗜盐古菌资源。伊吾盐湖是我国高原内陆盐湖, 部分湖区已形成盐沼地, 并有逐渐萎缩和消失的趋势, 湖内微生物资源亟待保护和利用。

参考文献

Dai X (戴欣), Wang BJ (王保军), Huang Y (黄燕), Zhang P (张平), Liu SJ (刘双江) (2005) Bacterial diversity in the

sediments of Taihu Lake by using traditional nutrient medium and dilution nutrient medium. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), **45**, 161–165. (in Chinese with English abstract)

Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO (2002) A new phylum of archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, **417**, 63–67.

Hill TCJ, Walsh KA, Harris JA, Moffett BF (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, **43**, 1–11.

Ma KP (马克平) (1994) Measurement of biotic community diversity. I. α diversity (1). *Chinese Biodiversity* (生物多样性), **2**, 162–168. (in Chinese)

Ma KP (马克平), Liu YM (刘玉明) (1994) Measurement of biotic community diversity. I. α diversity (2). *Chinese Biodiversity* (生物多样性), **2**, 231–239. (in Chinese)

McCaig AE, Glover LA, Prosser JI (1999) Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**, 1721–1730.

Oesterhelt D, Stoekenius W (1974) Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods in Enzymology*, **31**, 667–678.

Oren A (2002) Taxonomy of halophilic microorganisms: archaea, bacteria and eucarya. In: *Halophilic Microorganisms and Their Environments* (ed. Oren A), pp. 19–68. Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands.

Sehgal SN, Gibbons NE (1960) Effect of metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. *Canadian Journal of Microbiology*, **6**, 165–169.

Ventosa E, Quesada F, Rodríguez V, Ruiz-Berraquero F, Cormenzana AR (1982) Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. *Journal of General Microbiology*, **128**, 1959–1968.

Xu XW, Liu SJ, Tohty D, Oren A, Wu M, Zhou PJ (2005) *Haloterrigena saccharevitans* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 2539–2542.

Zheng XY (郑喜玉) (1995) *Salt Lakes of Xinjiang* (新疆盐湖志). Science Press, Beijing. (in Chinese)

Zheng XY (郑喜玉) (2002) *Salt Lakes of China* (中国盐湖志). Science Press, Beijing. (in Chinese)

(责任编辑: 时意专)