

新疆阿牙克库木湖可培养嗜盐古菌的种群结构

许学伟¹, 吴 敏^{1,*}, 吴月红¹, 张会斌²

(1. 浙江大学生命科学学院, 杭州 310058; 2. 新疆阿尔金山自然保护区管理处, 库尔勒市 841000)

摘要:从新疆南部的阿牙克库木湖采集了 19 个水样和 15 个土样, 分离培养嗜盐微生物。采用 PCR 方法获取其中 62 株嗜盐古菌 16S rRNA 基因序列。序列分析结果表明, 分离到的菌株分属 6 个属, 占已报道嗜盐古菌属总数的 27%, 其中以 *Halorubrum* 和 *Natrinema* 属的菌株为优势菌株。通过 Shannon 多样性指数分析发现, 阿牙克库木湖冬春两季嗜盐古菌多样性差异不明显。研究还发现 4 个嗜盐古菌新物种, 表明阿牙克库木湖蕴藏着具有地域特点的嗜盐古菌资源。

关键词:阿牙克库木湖; 嗜盐古菌; 多样性

文章编号: 1000-0933(2007)08-3119-05 中图分类号: Q938 文献标识码: A

Culturable Halophilic archaea of Ayakekumu Lake located in Xinjiang

XU Xue-Wei¹, WU Min^{1,*}, WU Yue-Hong¹, ZHANG Hui-Bin²

1 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

2 Altun Mountains National Nature Reserve Administration, Kuerle 841000, China

Acta Ecologica Sinica, 2007, 27(8): 3119 ~ 3123.

Abstract: Molecular diversity of halophilic archaea from Ayakekumu Lake was investigated by the polymerase chain reaction (PCR) amplification and culture methods. Ayakekumu Lake located in Altun Mountain in Xinjiang in high altitude (approximately 3880 m) with a slightly alkaline pH (7.9). Low temperature, abundant sunlight, low nutrient levels, high wind speed, and remote geographical location made Ayakekumu Lake become an ideal ecosystem to examine the biological diversity in a stress environment. Unfortunately, Ayakekumu Lake has not been systemically investigated because of the difficulty to get access to the area. 19 water samples and 15 soil samples were taken from 19 sites within Ayakekumu Lake in a field trip on December 2003 and March 2004. The cultivation of microbe used five different media. Under aerobic culture conditions, total 186 halophilic microorganisms, including halophilic archaea, moderately halophilic bacteria, and halotolerant bacteria were isolated. The 16S rRNA gene sequences of 62 red strains were amplified using PCR, determined by DNA sequencer and analyzed thought BLASTn program subsequently. Results revealed that all sequences belonged to six genera grouped within the *Halobacteriaceae*. Mostly 16S rRNA gene sequences related to the genera *Halorubrum* (47%) and *Natrinema* (24%) were detected. The observed microdiversity reflected the conditions of the habitat, which select for better adapted microbes. Haloarchaeal strains were assigned to operational taxonomic units (OTUs) based on sequence analysis. Subsequent analysis using Shannon index indicated that cultured halophilic archaeal diversities are not

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(973 计划)(2004CB719604-3); 国家自然科学基金资助项目(30670048); 中国博士后科学基金资助项目(2005038636)

收稿日期:2006-01-17; **修订日期:**2007-05-24

作者简介:许学伟(1978 ~), 男, 上海人, 博士, 主要从事微生物资源与应用研究。

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wumin@zju.edu.cn

Foundation item: The project was financially supported by Major State Basic Research Development Program of China (No. 973 Program) (No. 2004CB719604-3); National Natural Science Foundation of China (No. 30670048); China Postdoctoral Science Foundation (No. 2005038636)

Received date: 2006-01-17; **Accepted date:** 2007-05-24

Biography: XU Xue-Wei, Ph. D., mainly engaged in molecular genetics and microbiology.

significantly different between winter samplings and spring's in Ayakekumu Lake. Similarity values of haloarchaeal 16S rRNA gene sequences to known sequences were less than 97%, suggesting the presence of two novel taxa. In addition, taxonomic characteristics of *Natrinema altunense* and *Halobiforma lacisalsi* isolated from Ayakekumu Lake have been described previously. The discovery of novel species provides new opportunity to further examine the diversity of these halophilic microorganisms in Ayakekumu Lake.

Key Words: Ayakekumu Lake; halophilic archaea; diversity

我国幅员辽阔、盐湖星罗棋布,面积大于 1 km^2 的人迹现代盐湖 813 个,蕴藏着丰富的嗜盐微生物资源^[1]。嗜盐古菌是一类生存于高盐环境中的古菌,其一般呈红色,最低生长盐浓度为 1.5 mol/L 。《伯杰氏细菌系统手册》(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)第 2 版,将嗜盐古菌分为单科 14 个属^[2]。到 2005 年 12 月,分类命名的嗜盐古菌增加到 21 个属,62 个种^[3-9],其中包括来自我国盐湖的 4 个属 16 个种。

新疆地貌轮廓明显、地域多样性显著,自南向北分布阿尔泰山、天山和昆仑山三大山系,其间夹杂准葛尔和塔里木两个荒漠盆地。选择位于南疆昆仑山-阿尔金山山间盆地的阿牙克库木湖,研究新疆地区高原盐湖可培养嗜盐古菌的多样性。

1 材料和方法

1.1 样品的采集和处理

阿牙克库木湖地处新疆巴音郭楞蒙古自治州若羌县境内,东经 $89^{\circ}01' \sim 89^{\circ}40'$,北纬 $37^{\circ}22' \sim 37^{\circ}30'$ 。湖长 47 km,宽 7 ~ 18 km,面积 870 km^2 ,湖水东浅西深,南浅北深,湖面海拔 3880 m,湖水矿化度 157.386 g/L ,pH 值 7.90,湖水的化学类型为硫酸盐型硫酸镁亚型。由于交通不便,盐湖资源尚未得到开发利用^[1]。

2003 年 12 月 18 日,从阿牙克库木湖采集 4 份水样;2004 年 3 月 10 日和 12 日,分别于盐湖东部采集水样与土样各 8 份,西部采集水样与土样各 7 份(图 1)。水样为岸边卤水,土样为距离岸边 5 ~ 10 m 约 10 cm 深的浅层土壤。样品采集后放于 4°C 阴暗保存,运抵实验室后立即分离嗜盐微生物。

1.2 菌株的分离和保藏

菌种分离采用 DSMZ Medium 97、DSMZ Medium 823、HM^[10]、CM^[11] 和 O-S 培养基^[12]。培养基配方如下:

DSMZ Medium 97 (/L) 7.50 g Casamino acids (Difco), 10.00 g 酵母膏 (Difco), 3.00 g 柠檬酸三钠, 2.00 g 氯化钾, 20.00 g 七水硫酸镁, 0.05 g 七水硫酸亚铁, 0.20 mg 硫酸锰, 250.00 g 氯化钠, pH 7.4.

DSMZ Medium 823 (/L) 125.0 g 氯化钠, 160.0 g 六水氯化镁, 5.0 g 硫酸钾, 0.1 g 水合氯化钙, 1.0 g 酵母膏 (Difco), 1.0 g Casamino acids (Difco), 2.0 g 淀粉, pH 7.0.

HM (/L) 100.0 g 氯化钠, 2.0 g 氯化钾, 1.0 g 七水硫酸镁, 0.36 g 水合氯化钙, 0.23 g 溴化钠, 0.06 g 碳酸氢钠, 少量氯化铁, 5.0 g 蛋白胨 (Difco), 10.0 g 酵母膏 (Difco), 1.0 g 葡萄糖, pH 7.2 ~ 7.4.

CM (/L) 7.50 g Casamino acids (Difco), 10.00 g 酵母膏 (Difco), 3.00 g 柠檬酸三钠, 2.00 g 氯化钾, 20.00 g 七水硫酸镁, 0.05 g 七水硫酸亚铁, 200.00 g 氯化钠, pH 7.2.

O-S 培养基 (/L) 200.00 g 氯化钠, 20.00 g 七水硫酸镁, 3.00 g 柠檬酸三钠, 2.00 g 氯化钾, 0.20 g 无水

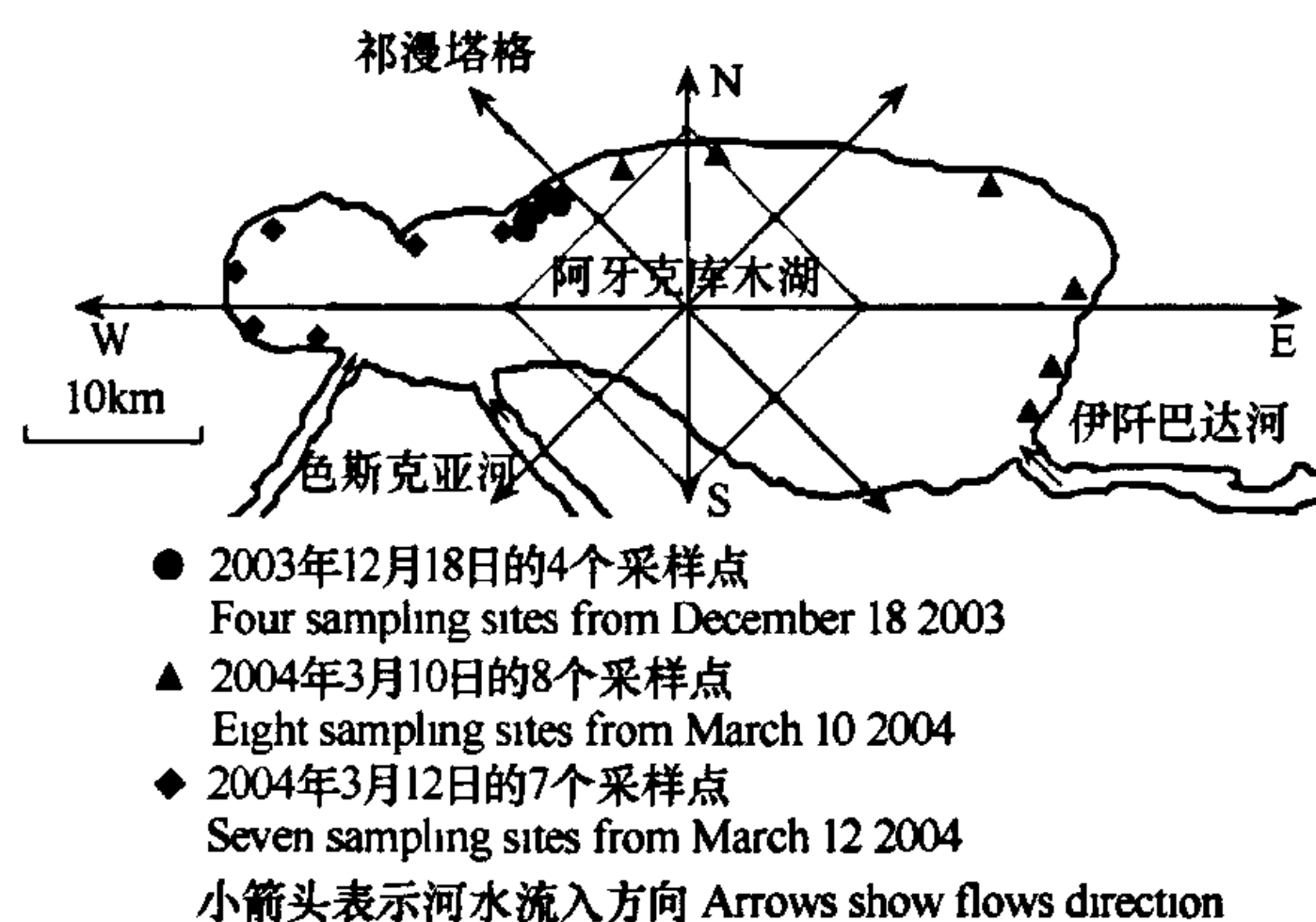


图 1 新疆阿牙克库木湖采样点分布图

Fig. 1 The map of sampling sites around Ayakekumu Lake in Xinjiang

氯化钙,10.00 g 细菌蛋白胨 L37 (Oxoid),pH 7.0.

土样用相应液体培养基悬浮;水样经 0.45 μm 和 0.22 μm 滤膜压滤后,滤膜加入液体培养基中,培养液梯度稀释涂布平板,37 ℃光照培养。经反复划线纯化,直至获得单菌落。菌株采用液蜡斜面 4 ℃和甘油管-80 ℃长期保藏。

1.3 基因组总 DNA 的提取

采用嗜盐古菌 DNA 少量快速提取方法,新鲜菌体加 400 μl 无菌水破细胞,70℃水浴处理 10 min。

1.4 16S rDNA 序列的扩增与鉴定

PCR 扩增引物为 22F:5'-ATTCCGGTTGATCCTGC-3';和 1540R:5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3'。PCR 反应条件为 50μl 反应体系加入 50 ng DNA 模板,30 个循环;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有限公司纯化并进行 DNA 序列测定,测序引物为 22F,测定的序列长度大于 500 bp。

测定的序列采用 Blastn 进行比对。相似性低于 97% 的序列,采用 22F、1540R 和 519uF (5'-CAGCMGCCGCGGTAATAC-3'^[13])重新进行测定。测定后序列长度大于 1300 bp,为 16S rDNA 序列长度的 90% 以上。

1.5 嗜盐古菌的多样性分析

定义 16S rDNA 序列相似性低于 97% 作为不同的分类单元^[14,15]。采用 Shannon 多样性指数进行多样性分析和比较。

2 结果

2.1 嗜盐古菌 16S rRNA 基因序列分析

利用 5 种不同培养基,从阿牙克库木湖分离纯化到 186 株嗜盐古菌、中度嗜盐菌和耐盐菌。采用古菌通用引物,扩增获取了其中 57 株菌株的 16S rRNA 基因序列。通过 2002 年 4 月采集的样品,又分离测定了 5 株菌株的 16S rRNA 基因序列。将所获得的 62 个序列,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,阿牙克库木湖嗜盐古菌以 *Halorubrum* 和 *Natrinema* 属的菌株占优势,分别占总数的 47% 和 24%。分析结果见表 1。

表 1 阿牙克库木湖不同样品分离菌株的分布表
Table 1 Distribution of different halophilic strains within Ayakekumu Lake

属名 Genus	种名 Species	菌株数目 (ind.) 2002 年 4 月 Number of strains April 2002	序列相 似性(%) Similarity (%)	菌株数目 (ind.) 2003 年 12 月 Number of strains December 2003	序列相 似性(%) Similarity (%)	菌株数目 (ind.) 2004 年 3 月 10 日 Number of strains March 10 2002	序列相 似性(%) Similarity (%)	菌株数目 (ind.) 2004 年 3 月 12 日 Number of strains March 12 2002	序列相 似性(%) Similarity (%)	合计 (ind.) Total
<i>Haloarcula</i>	<i>Har. argentinensis</i>	1	99	0	-	0	-	0	-	1
	<i>Har. hispanica</i>	1	99	0	-	0	-	0	-	1
<i>Halobiforma</i>	<i>Hbf. lacisalsi</i>	1	100	0	-	0	-	0	-	1
<i>Natrinema</i>	<i>Nnm. altunense</i>	2	98-100	11	98-99	2	98-99	0	-	15
<i>Halorubrum</i>	<i>Hrr. xinjiangense</i>	0	-	2	98-99	6	97-99	8	97-99	16
	<i>Hrr. saccharovororum</i>	0	-	0	-	4	98-99	7	97-99	11
	<i>Hrr. sodomense</i>	0	-	0	-	1	97	0	-	1
	<i>Hrr. sp. nov.</i>	0	-	0	-	1	96	0	-	1
<i>Haloterrigena</i>	<i>Htg. thermotolerans</i>	0	-	2	98-99	0	-	0	-	2
	<i>Htg. sp. nov.</i>	0	-	0	-	3	95-96	0	-	3
<i>Halovivax</i>	<i>Halovivax asiaticus</i>	0	-	3	98-99	6	98-99	1	99	10
总计 Total		5		18		23		16		62

2.2 嗜盐古菌多样性分析

定义 16S rDNA 序列相似性低于 97 % 作为不同分类单元,采用 Shannon 多样性指数进行多样性计算(表 2)。结果表明,高原盐湖分离到的 62 株嗜盐古菌可划分为 11 个不同的分类单元,冬春两季嗜盐古菌多样性差异不明显。

表 2 阿牙克库木湖嗜盐古菌多样性指数值

Table 2 Diversity indices of halophilic archaea in Ayakekumu Lake				
多样性指数 Diversity index	2002 年 4 月 春季 April 2002 spring	2003 年 12 月 冬季 December 2003 winter	2004 年 3 月 10 日 春季,盐湖东部 March 10 2004 spring, east	2004 年 3 月 12 日 春季,盐湖西部 March 12 2004 spring, west
Shannon 多样性指数 H' Shannon index H'	1.33	1.09	1.76	0.88

Shannon 多样性指数计算公式 $H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$ [16] Formula for Shannon index: $H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$ [16]; S 代表样品中的物种数目 S , the number of species in the sample; P_i 代表属于种 i 的个体在全部个体中的比例 P_i , the proportion of strains in the i th species [16]

3 讨论

阿牙克库木湖是地处我国新疆南部的高原内陆盐湖,卤水类型主要为湖表卤水。湖水中钠离子(47 g/L)含量少,矿化度(157.386 g/L)低于新疆其它代表性盐湖,例如:艾比湖(晶间卤水,377.7 g/L)、艾丁湖(晶间卤水,327.6 g/L)、巴里坤湖(湖表卤水,244.6 g/L)等[1]。湖盆高寒,终年无夏,平均气温 0 ℃,最高气温 28 ℃。嗜盐古菌属于中温微生物,最低生长盐浓度为 1.5 mol/L,最适生长温度一般为 37 ~ 45 ℃。尽管生存环境恶劣,仍分离获得 62 株嗜盐古菌,分属 11 个不同的分类单元,表明阿牙克库木湖蕴藏着一定的嗜盐微生物资源。

多样性指数可以反映物种的多样性状况。尽管季节不同,微生物群落结构在不断变化,Shannon 多样性指数却表明,阿牙克库木湖冬春两季嗜盐古菌多样性差异不明显。冬季样品中发现的嗜盐古菌物种,在春季样品中都具有类似的菌株,并且在物种类型的数量上前者小于后者。结果表明随着季节的变迁,部分微生物开始生长,达到可培养要求。阿牙克库木湖嗜盐古菌以 *Halorubrum* 和 *Natrinema* 属的菌株占优。这两个属的菌株具有细菌视蛋白基因,该基因编码产物细菌视紫红质(Bacteriorhodopsin, BR)蛋白可以利用光能,提供细胞新陈代谢的能量。阿牙克库木湖植被稀疏、种类稀少,缺乏营养,但高原太阳辐射强烈,年日照时数可达 2900 h。相对其它不具有 BR 蛋白的嗜盐古菌而言,这两类微生物更具竞争优势。

通过对阿牙克库木湖可培养嗜盐微生物种群结构和物种多样性研究,发现 5 个属的嗜盐古菌菌株,占嗜盐菌科已报道属的 24%。鉴于 *Halovivax asiaticus*(表 2)是刚发表新属[17],阿牙克库木湖发现的嗜盐古菌属占总数的 27%。研究还发现 4 个新物种(表 2),其中 *Nm. altunense* 和 *Hbf. lacisalsi*[18,19]已报道。这表明阿牙克库木湖蕴藏着具有地域特点的嗜盐古菌资源。但 16S rRNA 基因序列只是微生物中的一个重要基因,代表一个分类学指标,确定其余特色菌株的分类地位,还需要进一步的多相分类学研究。

References:

[1] Zheng X Y. Summarization of salt lake in China. In: Zheng X Y ed. Salt lake in China. Beijing: Science Press, 2002. 4 — 244.

[2] Grant W D, Kamekura M, McGentiy T J, et al. Class III. Halobacteria class. nov. In: Boone D R, Castenholz R W and Garrity, G M eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd. New York: Springer, 2001. 294 — 301.

[3] WainØ M W, Tindall B J, Ingvorsen K. *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2000, 50(1): 183 — 190.

[4] Vreeland R H, Straight S, Krammes J, et al. *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. Extremophiles, 2002, 6(6): 445 — 452.

[5] Oren A, Elevi R, Watanabe S, et al. *Halomicrobium mukohataei* gen. nov., comb. nov., and emended description of *Halomicrobium*

- mukohataei. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 2002, 52(5): 1831 – 1835.
- [6] Hezayen F F, Tindall B J, Steinbüchel A, *et al.* Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestis* gen. nov. , sp. nov. , and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 2002, 52(6): 2271 – 2280.
- [7] Fan H P, Xue Y F, Ma Y H, *et al.* *Halorubrum tibetense* sp. nov. , a novel haloalkaliphilic archaeon from Lake Zabuye in Tibet, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 2004, 54(4): 1213 – 1216.
- [8] Itoh T, Yamaguchi T, Zhou P J, *et al.* *Natronolimnobium baerhuense* gen. nov. sp. nov. , and *Natronolimnobium innermongolium* sp. nov. , novel haloalkaliphilic archaea isolated from soda lakes in Inner Mongolia, China. Extremophiles, 2005, 9(1): 111 – 116.
- [9] Xue Y F, Fan H P, Ventosa A, *et al.* *Halalkalicoccus tibetensis* gen. nov. , sp. nov. , representing a novel genus of haloalkaliphilic archaea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 2005, 55(6): 2501 – 2505.
- [10] Ventosa A, Quesada E, Rodríguez-Valera F, *et al.* Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative rods. J. Gen. Microbiol. , 1982, 128: 1959 – 1968.
- [11] Sehgal S N, Gibbons N E. Effect of metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. 1960. 6(2): 165 – 169.
- [12] Oesterhelt D, Stoeckenius W. Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. Methods Enzymol. , 1974, 31: 667 – 678.
- [13] Huber H, Hohn M J, Rachel R, *et al.* A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. Nature, 2002, 417 (6884): 63 – 67.
- [14] McCaig A E, Glover L A, Prosser J I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. Appl. Environ. Microbiol. , 1999, 65(4): 1721 – 1730.
- [15] Dai X, Wang B J, Huang Y, *et al.* Bacterial diversity in the sediments of Taihu Lake by using traditional nutrient medium and dilution nutrient medium. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(2): 161 – 165.
- [16] Hill T C J, Walsh K A, Harris J A, *et al.* Using ecological diversity measures with bacterial communities. FEMS Microbiol. Ecol. , 2003, 43(1): 1 – 11.
- [17] Castillo A M, Gutiérrez M C, Kamekura M, *et al.* *Halovivax asiaticus* gen. nov. , sp. nov. , a novel extremely halophilic archaeon isolated from Inner Mongolia, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 2006, 56(4): 765 – 770.
- [18] Xu X W, Ren P J, Liu S J, *et al.* *Natrinema altunense* sp. nov. , an extremely halophilic archaeon isolated from a salt lake in Altun Mountain in Xinjiang, China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 2005, 55(3): 1311 – 1314.
- [19] Xu X W, Wu M, Zhou P J, *et al.* *Halobiforma lacisalsi* sp. nov. , isolated from a salt lake in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. , 2005, 55 (4): 1949 – 1952.

参考文献:

- [1] 郑喜玉. 中国盐湖总论. 见:郑喜玉主编. 中国盐湖志. 北京: 科学出版社, 2002. 4 ~ 244.
- [15] 戴欣, 王宝君, 黄燕, 等. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性. 微生物学报, 2005, 45(2): 161 ~ 165.