

一株嗜盐严格厌氧细菌 S191 的分离与系统发育分析

石孔兰, 朱丽娴, 吴敏, 朱旭芬*

(浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310058)

摘要:采用 Hungate 滚管法, 从东北太平洋结壳区深海沉积物中分离纯化得到中度嗜盐、严格厌氧发酵细菌 S191, 通过扩增及测定其 16S rDNA 基因序列, 利用“Clustalx”和“Mega”软件对该序列作同源性分析及系统发育分析, 建立了嗜盐严格厌氧细菌属的系统发育树, 表明菌株 S191 的 16S rDNA 基因序列与 *Halanaerobium* 属菌株的最高同源性为 98.5%, 革兰氏染色呈阴性、直杆状, $0.3\sim 0.6\ \mu\text{m}\times 1.8\sim 3.0\ \mu\text{m}$ 、无运动、不产生芽孢, 生长 NaCl 质量浓度为 5%~25%, 最适 NaCl 质量浓度为 7.5%~10%, 生长 pH 值 6.0~8.9, 最适 pH 值为 7.8~8.0, 生长温度 $15\sim 42\ ^\circ\text{C}$, 最适温度为 $32\sim 37\ ^\circ\text{C}$, 最佳条件下代时约 3.2 h, 初步鉴定为 *Halanaerobium* 属内的一个新成员。

关键词:严格厌氧细菌; 嗜盐; 深海沉积物; 16S rDNA; 系统发育

中图分类号: Q 939

文献标志码: A

文章编号: 1008-9497(2009)06-714-06

SHI Kong-lan, ZHU Li-xian, WU Min, ZHU Xu-fen* (College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Isolation and phylogenetic analysis of halophilic, strictly anaerobic eubacteria S191. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2009, 36(6): 714-719

Abstract: Moderately halophilic, strictly anaerobic eubacteria S191 was isolated and purified from the sediment in Northeast Pacific deep-sea nodule province by using Hungate roll-tube technique, the 16S rDNA encoding gene of S191 was proliferated by PCR, the sequence was determined, and homology analysis was completed by “Clustalx” and “Mega” software, a phylogenetic tree of *Halanaerobium* was constructed, S191 is considered to be a new member of *Halanaerobium*. It is a Gram-negative, rod-shaped, non-motile, non-spore-forming obligate anaerobe that owns a cell size of $0.3\sim 0.6\ \mu\text{m}\times 1.8\sim 3.0\ \mu\text{m}$. Growth was observed in the presence of 5%–25% NaCl, the optimum salt concentration for growth is 7.5%–10%. It grows at pH 6.0–8.9 and the optimum pH for growth is 7.8–8.0. It grows well at temperature $15\sim 42\ ^\circ\text{C}$, and the optimum temperature for growth is $32\sim 37\ ^\circ\text{C}$. The doubling time is about 3.2 h when grown at optimal condition.

Key Words: strict anaerobe; halophilic; deep-sea sediment; 16S rDNA; phylogenesis

嗜盐厌氧微生物一般分布在盐湖、盐碱地和腌制食品等高盐份而又极度缺溶解氧的生态环境中, 如著名的死海、美国的犹他大盐湖等, 这些生境所处的地理位置很特别, 由于温度高、光照强, 导致水分蒸发很快, 从而形成了高盐环境^[1-2]. 这样的生境中动植物物种较少, 但是却可能含有很丰富的有机物质, 这为嗜盐厌氧微生物的大量繁殖创造了很好的条件, 但是目前人们对这类环境的厌氧生物体了解甚少^[3]. 自

从 1983 年, 由 Zeikus 等^[4] 率先描述了一株分离自美国犹他州大盐湖沉积物中的嗜盐严格厌氧发酵细菌 *Haloanaerobium praevalens*, 及至 1984 年 Oren 等人^[5] 提议建立一新科 *Haloanaerobiaceae* 来描述此类嗜盐、严格厌氧、发酵型、化能异养型细菌, 1995 年 Rainey 等^[6] 建议成立一个新目 *Haloanaerobiales* 和一个新科 *Halobacteroidaceae*, 以此来描述日益扩大的盐厌氧菌家族, 近来发现的两个新属是

收稿日期: 2008-12-24.

作者简介: 石孔兰(1982-), 男, 硕士研究生, 主要从事厌氧微生物的研究.

* 通信作者, 副教授, E-mail: zhuxufen@mail.hz.zj.cn.

Halonatronum^[7]和*Selenihalanaerobacter*^[8]。至今,在系统分类学上对嗜盐专性厌氧发酵细菌已经建立了1目2科11属,共24个种以及2个亚种。

为了解嗜盐厌氧发酵细菌的多样性,本次研究以东太平洋结壳区深海沉积物为样品,用滚管法对其进行嗜盐、厌氧发酵细菌的分离纯化,从深海沉积物中分离得到一株嗜盐、严格厌氧细菌的培养物 S191,对其进行16S rRNA基因的同源性和系统发育分析,确定其系统发育地位,并进行菌株 S191 的部分生理生化指标分析。

1 材料和方法

1.1 菌株

菌株 S191 分离自东北太平洋结壳区深海沉积物中,参比菌株 *Halanaerobium congolense* 购于德国微生物保存中心 DSMZ 11287,基因克隆受体菌株为大肠杆菌 *E. coli* DH5 α ,实验室保存。

1.2 培养基与分离方法

菌株富集与分离培养基采用修改后的 DSMZ 933 号培养基,微量元素没有添加,增添了 2.5 g · L⁻¹ 的酵母抽提物(OXOID),固体培养基添加 2% 琼脂粉。鉴定培养基(g · L⁻¹)为: NaCl 100.0, KCl 1.00, KH₂PO₄ 0.35, MgSO₄ · 7H₂O 0.50, L-半胱氨酸 0.05, 酵母抽提物 2.0, 胰蛋白酶 2.0, 微量元素溶液(M144) 10.00 mL, Na₂S · 9H₂O (2%) 20.00 mL, 葡萄糖(1 mol · L⁻¹) 20.00 mL, 蒸馏水 950.00 mL, Final pH 8.0。

敲取-20℃保存下的沉积物样品约1.0g到装有25.0mL富集培养基的60mL厌氧瓶中,厌氧瓶中持续通入无氧的高纯度氮气,振荡均匀后在35℃下黑暗中静置,富集培养一周。培养液经过梯度稀释与涂布滚管,挑单菌落液体培养,如此反复分离纯化3次,用普通显微镜镜检。

1.3 细菌染色体 DNA 的抽提与 16S rDNA 的扩增

DNA 抽提方法见文献[9],扩增 16S rDNA 的引物序列为细菌通用引物:

上游:5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3'

下游:5'-ACGGHTACCTTGTACGACTT-3'

PCR 扩增条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 55℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 75 s, 最后再 72℃ 延伸 10 min, 50 μ L 反应体系进行 33 个循环。

1.4 扩增产物的纯化、克隆和测序

PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳确认, 割胶回收, 用 UNIQ-10 柱 PCR 产物纯化试剂盒(购于上海

生工)进行纯化。纯化产物确认后,采用 T/A 克隆法,即将产物克隆到 pMD19-T 质粒上,接着转化到 *E. coli* DH5 α 菌株制备好的感受态细胞中,在含氨苄青霉素的 LB 培养基平板上过夜培养,蓝白斑筛选,PCR 和酶切确认,随机挑选 2 个重组质粒送至北京诺赛基因组研究中心测序,测序引物为通用引物 M13F 和 M13R。

1.5 系统发育树的构建

将菌株 S191 的 16S rDNA 序列用 GenBank 数据库中的 Blastn 做比较,并从该数据库中获取嗜盐厌氧发酵细菌属参比菌株的 16S rDNA 序列,并采用软件 Clustal X 1.8 进行多序列匹配排列,采用软件 Mega 4 构建系统发育树,通过序列数据计算矩阵距离,使用 Neighborjoining 方法,进行系统进化树估算,重复数为 1 000,计算各分支的置信度。

1.6 菌体形态特征和生长条件试验

1.6.1 个体形态

在固体分离培养基中,无氧黑暗静置培养 3 d,革兰氏染色,然后在普通光学显微镜(Olympus BX40)下观察细菌个体形状,同时测定个体大小。在固体鉴定培养基中厌氧培养至对数生长期,用透射电子显微镜(JEM-1200EX,浙江大学分析测试中心)观察细菌大小、有无鞭毛。半固体穿刺实验,测试菌株 S191 的运动性。

1.6.2 菌落特征

菌液梯度稀释后,涂布接种于滚管中,35℃无氧黑暗静置培养 3 d,观察菌落特征。

1.6.3 厌氧培养

用 3 种培养基进行试验,厌氧培养基按照 Hungate 厌氧技术,好氧培养基按照好氧菌培养方法,微好氧培养基按照培养基中不加还原剂的厌氧培养基。35℃培养 10 d。两次重复实验。

1.6.4 生长条件试验

生长条件试验用鉴定培养基,采用 TU-1800 型分光光度计在 660 nm 处测量最适盐浓度、最适 pH、最适温度等的生长情况。做 3 次重复实验。

1.6.5 生长代时测定

以鉴定培养基试验,在最佳培养条件下用 TU-1800 型分光光度计在 660 nm 处测量不同时间段的吸光度。两次重复实验。

2 结果

2.1 菌株的分离纯化

液体富集培养基逐渐混浊变黑,产生大量气泡,

涂布厌氧管中,纯化后得到菌株 S191.

2.2 菌株 16S rDNA 的扩增结果和序列

对菌株 S191 通过基因扩增得到一段长度约为 1.5 kb 的序列,电泳显示与参比菌 *Haloanaerobium congolense* 的 16S rDNA 序列大小相似.该片段经过克隆测序得到菌株 S191 含 1 473 个核苷酸,该

序列已经登录到 GenBank,序列号为 FJ858788.

2.3 嗜盐、严格厌氧细菌的系统发育

通过 Blastn 和 Fasta 比对,获取相近属和种的标准菌株的有效序列,以其为基础,经过 MEGA 4 分析后建立系统发育树,所构建的 *Halanaerobium* 系统发育树见图 1.

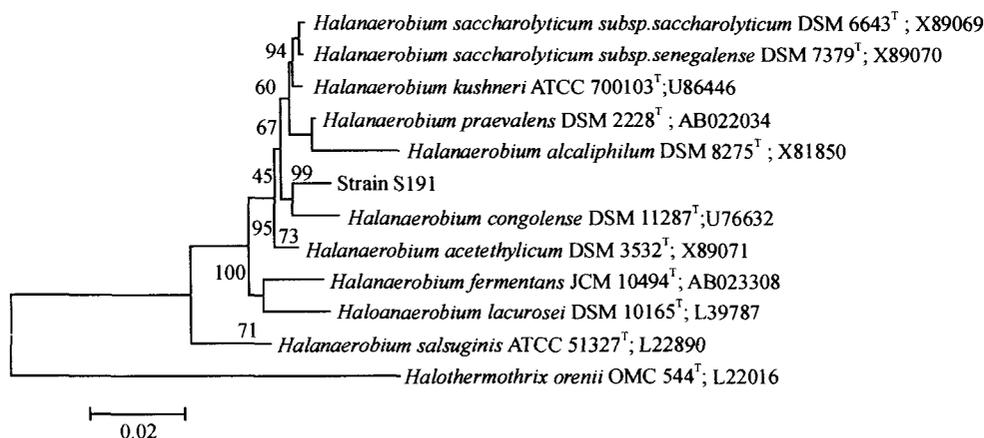


图 1 基于 16S rDNA 序列应用邻接方法对菌株 S191 构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences from type strains of *Halanaerobium* species and strain S191.

The tree was constructed using the Neighbor-Joining Method with bootstrap values calculated from 1000 resamplings

2.4 形态特征

一系列观察试验表明,菌株 S191 为革兰氏阴性菌株,不运动,直杆状,菌体大小为 $0.3 \sim 0.6 \mu\text{m} \times 1.8 \sim 3.0 \mu\text{m}$,电镜结果如图 2.

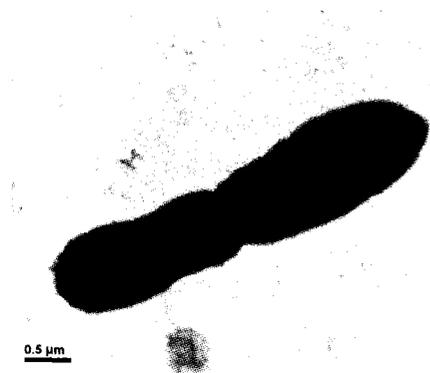


图 2 菌株 S191 电子显微镜结果

Fig. 2 Transmission electronic photograph of strain S191

在稀释度 10^{-4} 处,滚管培养基上典型的菌落直径为 2 mm,乳白色带浅黄色,有圆环,半透明,表面湿润,当中微隆起,边缘齐整,结果如图 3.

2.5 厌氧试验

菌株 S191 对氧敏感度高,只在专性厌氧培养基上生长,而在好氧培养基和微好氧培养基上生长受到抑制.表示为严格厌氧微生物.

2.6 生长条件与生长代时

盐浓度对菌株生长的影响:菌株 S191 生长盐浓度为 $5\% \sim 25\%$,在 3% 和 30% 处都不生长,最佳生

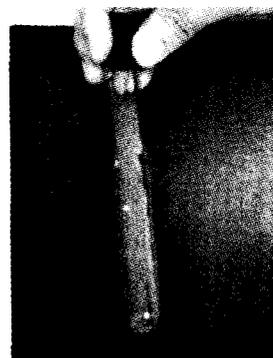


图 3 菌株 S191 的菌落形态图

Fig. 3 Colony photograph of strain S191

长盐度为 $7.5\% \sim 10\%$,属于中度嗜盐菌.温度对菌株生长的影响:菌株 S191 生长温度在 $15 \sim 42 \text{ }^\circ\text{C}$,最佳生长在 $32 \sim 37 \text{ }^\circ\text{C}$.pH 值对菌株生长的影响:菌株 S191 的 pH 值在 $6.0 \sim 8.9$,最适 pH 值在 $7.8 \sim 8.0$.

以上 3 种因子对菌株生长影响的结果分别如图 4-6 所示.

菌株 S191 的代时测定根据计算公式 $G = (t_2 - t_1) / 3.322(\lg OD_2 - \lg OD_1)$,取三对在对数生长期的值,算得加权平均值 $G = 3.2 \text{ h}$.

3 讨论

1937 年, Baumgartner 从腌制的地中海凤尾鱼中首次分离到一株嗜盐专性厌氧菌“*Bacteroides*

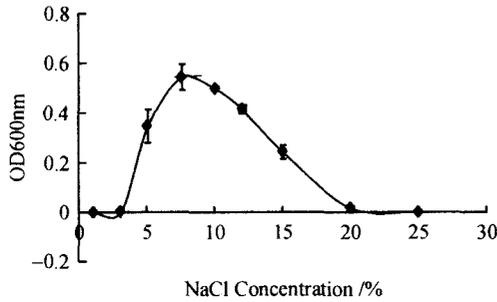


图 4 菌株 S191 生长的盐度曲线图
Fig. 4 Growth effect of strain S191 on NaCl concentration gradient

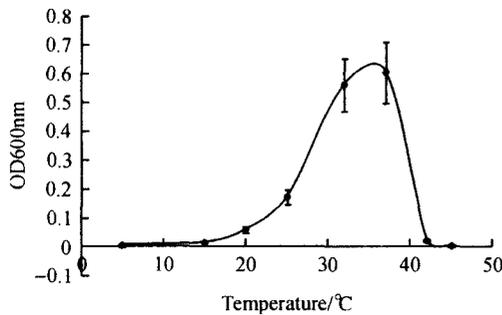


图 5 菌株 S191 生长的温度曲线图
Fig. 5 Growth effect of strain S191 on Temperature gradient

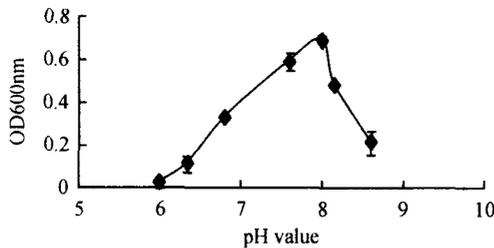


图 6 菌株 S191 生长的 pH 值梯度曲线图
Fig. 6 Growth effect of strain S191 on pH gradient

halosmophilus”^[10], 该菌株没有得到公认, 现已不存在。此后, 对高盐生境的严格厌氧发酵细菌的部分研究结果, 见表 1 所述。借助 Hungate 滚管技术, 从东北太平洋结壳区深海沉积物分离到菌株 S191, 革兰氏染色呈阴性, 直杆状, $0.3 \sim 0.6 \mu\text{m} \times 1.8 \sim 3.0 \mu\text{m}$ 、无运动、不产生芽孢, 生长 NaCl 质量浓度为 5%~25%, 最适 NaCl 为 7.5%~10%, 生长 pH 值 6.0~8.9, 最适 pH 值为 7.8~8.0, 生长温度 15~42 °C, 最适温度为 32~37 °C, 最适条件下代时约 3.2 h, 通过 16S rDNA 序列比对和系统发育分析, 表明它属于盐厌氧菌属 *Halanaerobium*, 比对后发现菌株 S191 序列与 *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *Saccharolyticum* 相似度最高, 达 98.5%, 而通过构建的系统发育树发现, 菌株 S191 却与 *Halanaerobium*

congolense 最为邻近, 其序列同源性达 97.5%。表 1 中各标准菌株的最适 pH 值都在 7.5 以下, 而菌株 S191 的最适 pH 值为 7.8~8.0, 这是首次从深海沉积物中分离到的嗜盐、专性厌氧、发酵细菌, 很可能是一株新种, 需作进一步实验分析确定。

嗜盐厌氧新资源的开发, 有助于了解不同生境中的嗜盐厌氧微生物资源, 目前仅集中于盐湖、腌制食物中, 今后可以尝试开辟新途径, 比如从高盐生活废水和工业废水、中低度嗜盐环境中去开发, 不仅有益于研究环境微生物资源和生理代谢机制, 而且可以为工业酶制剂的开发^[19]、高含盐水污染的治理等, 打下良好的基础, 如 *Halanaerobiaceae* bacterium SLAS-1 的发现用于研究砷的地球化学循环^[20], 而 Kapdan 等^[21]用 *Halanaerobium lacusrosei* 来研究去除废水 COD 等。

参考文献 (References):

- [1] 凌代文. 厌氧微生物学研究的新进展[J]. *微生物学通报*, 1995, 22(4):245-252.
LING Dai-wen. Recent advances of anaerobic microbiology research[J]. *Microbiology*, 1995, 22(4):245-252.
- [2] KOBAYASHI T, KIMURA B, FUJII T. Strictly anaerobic halophiles isolated from canned Swedish fermented herrings (Surstromming)[J]. *Int J Food Microbiol*, 2000, 54:481-489.
- [3] OREN A. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications[J]. *J Ind Microbiol Biot*, 2002, 28:56-63.
- [4] ZEIKUS J G, HEGGE P W, THOMPSON T E, et al. Isolation and description of *Haloanaerobium praevalens* gen. nov. and sp. nov., an obligately anaerobic halophile common to great salt lake sediments[J]. *Curr Microbiol*, 1983, 9:225-234.
- [5] OREN A, PASTER B J, WOESE C R. *Haloanaerobiaceae*: A new family of moderately halophilic, obligatory anaerobic bacteria[J]. *Syst Appl Microbiol*, 1984, 5(1):71-80.
- [6] RAINEY F A, ZHILINA T N, BOULYGINA E S, et al. The taxonomic status of the fermentative halophilic anaerobic bacteria; description of *Haloanaerobiales* ord. nov., *Halobacteroidaceae* fam. nov., *orenia* gen. nov. and further taxonomic rearrangements at the genus and species level[J]. *Anaerobe*, 1995, 1(4):185-199.
- [7] ZHILINA T N, GARNOVA E S, TOUROVA T P, et al. *Halonaerobium saccharophilum* gen. nov. sp. nov.: A new haloalkaliphilic bacterium of the order *Haloanaerobiales* from lake Magadi [J]. *Microbiology*,

表 1 盐厌氧菌属内各菌株部分分类学特征
Table 1 Taxonomic characteristics of strains in *Halanaerobium*

species	<i>Halanaerobium</i> <i>saccharolyticum</i> subsp. <i>Saccharo-</i> <i>lyticum</i> ^[11]	<i>Halanaerobium</i> <i>acetethylicum</i> ^[2]	<i>Halanaerobium</i> <i>alcaliphilum</i> ^[13]	<i>Halanaerobium</i> <i>congolense</i> ^[14]	<i>Halanaerobium</i> <i>fermentans</i> ^[15]	<i>Halanaerobium</i> <i>kushneri</i> ^[16]	<i>Halanaerobium</i> <i>lacusrosei</i> ^[17]	<i>Halanaerobium</i> <i>praevalens</i> ^[1]	<i>Halanaerobium</i> <i>salsuginis</i> ^[18]	<i>Halanaerobium</i> Strain S191
Cell Size/ μm	0.5~0.7 \times 1.0~1.5	0.4~0.6 \times 1.0~1.5	0.8 \times 3.3~5.0	0.5~1 \times 2~4	1~1.2 \times 2.7~3.3	0.5~0.8 \times 0.7~3.3	0.4~0.6 \times 2~3	0.9~1.1 \times 2.0~2.6	0.3~0.4 \times 2.6~4.0	0.3~0.6 \times 1.8~3.0
Gram stain	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative	negative
Morphology	rods	rods	rods	short rods	rods	rods	rods	rods	rods	rods
Motility	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
Flagella	peritrichous	peritrichous	peritrichous	-	peritrichous	peritrichous	peritrichous	-	-	-
Spores	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl range/%	3~30	5~22	2.5~25	4~24	7~25	9~18	7.5~34	2~30	6~24	5~25
(optimum)/%	10	10	10	10	10	12	18~20	13	9	7.5~10
Temp. range/ $^{\circ}\text{C}$	15~47	15~45	25~50	25~45	15~45	20~45	20~50	5~50	22~51	15~42
(optimum)/ $^{\circ}\text{C}$	37~40	34	37~40	42	35	35~40	40	37	40	32~37
pH range	6.0~8.0	5.4~8.0	5.8~10.0	6.3~8.5	6.0~9.0	6.0~8.0	ND	6.0~9.0	5.6~8.0	6.0~8.9
(optimum)	7.5	6.3~7.4	6.7~7.0	7.0	7.5	6.5~7.5	7.0	7.0~7.4	6.1	7.8~8.0
Doubling times/h	3.9	7.5	3.3	2.5	ND	NR	2.4	4.0	9.0	3.2
Sample Source	Sediment	Filter material	Sediment	Oil well head sample	Ovaries	Oil brine	Sediment	Sediment	Petroleum	Sediment
Site	Lake Sivash Crimea	shore gas and oil rids Gulf of Mexico	Great Salt Lake Utah, USA	African oil field	Salted puffer fish	Oil reservoir in central Oklahoma USA	A Retba Lake in Senegal	Great Salt Lake Utah, USA	reservoir fluid Ok, USA	deep-sea nodule province, Northeast Pacific

- 2001,70(1):64-72.
- [8] BLUM J S, STOLZ J F, OREN A. *Selenihalanaerobacter shriftiigen*. nov. sp. nov., a halophilic anaerobe from Dead Sea sediments that respire selenate[J]. **Arch Microbiol**, 2001,175:208-219.
- [9] 朱旭芬. **基因工程实验指导**[M]. 北京:高等教育出版社,2006:20-21.
ZHU Xu-fen. **Experiment Guide of Genetic Engineering** [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006:20-21.
- [10] BAUMGARTNER J G. The salt limits and thermal stability of a new species of anaerobic halophile[J]. **Food Res**, 1937,2:321-329.
- [11] CAYOL J L, OLLIVIER B, ANANISOH A L, et al. *Haloicola saccharolytica subsp. senegalensis subsp.* nov., isolated from the sediments of a hypersaline lake, and emended description of *Haloicola saccharolytica*[J]. **Int J Syst Evol Bacteriol**, 1994,44(4):805-811.
- [12] RENGIPAT S, LANGWORTHY T A, ZEIKUS J G. *Halobacteroides acetoethylicus* sp. Nov., a new obligately anaerobic halophile isolated from deep subsurface hypersaline environments[J]. **Syst Appl Microbiol**, 1988,11:28-35.
- [13] TSAI C R, GARCIA J L, PATEL B K C, et al. *Haloanaerobium alcaliphilum* sp. nov., an anaerobic moderate halophile from the sediments of great salt lake, utah[J]. **Int J Syst Evol Micr**, 1995,45(2):301-307.
- [14] RAVOT G, MAGOT M, OLLIVIER B, et al. *Haloanaerobium congolense* sp. nov., an anaerobic, moderately halophilic, thiosulfate and sulfurreducing bacterium from an african oil field[J]. **Microbiol Lett**, 1997,147:81-88.
- [15] KOBAYASHI T, KIMURA B, FUJII T. *Haloanaerobium fermentans* sp. nov., a strictly anaerobic, fermentative halophile isolated from fermented puffer fish ovaries[J]. **Int J Syst Evol Micr**, 2000,50:1621-1627.
- [16] BHUPATHIRAJU V K, MCLNERNEY M J, WOESE C R, et al. *Haloanaerobium kushneri* sp. nov., an obligately halophilic, anaerobic bacterium from an oil brine[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1999,49:953-960.
- [17] CAYOL J L, OLLIVIER B, PATEL B K C, et al. *Haloanaerobium lacusroseus* sp. nov., an extremely halophilic fermentative bacterium from the sediments of a hypersaline lake[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1995,45(4):790-797.
- [18] BHUPATHIRAJU VK, OREN A, SHARMA P K, et al. *Haloanaerobium salsugo* sp. nov., a moderately halophilic, anaerobic bacterium from a subterranean brine[J]. **Int J Syst Bacteriol**, 1994,44(3):565-572.
- [19] OREN A, GUREVICH P. The fatty acid synthetase complex of *Haloanaerobium praevalens* is not inhibited by salt[J]. **Microbiol Lett**, 1993,108:287-290.
- [20] OREMLAND R S, KULP T R, BLUM J S, et al. A microbial arsenic cycle in a saltsaturated extreme environment[J]. **Science**, 2005,308(27):1305-1308.
- [21] KAPDAN I K, ERTEN B. Anaerobic treatment of saline wastewater by *Halanaerobium lacusrosei* [J]. **Process Biochem**, 2007,42:449-453.
- [22] 时晗,吴敏,许学伟,等.嗜盐古菌中氯视紫红质基因序列的遗传分析[J]. **浙江大学学报:理学版**,2008,35(1):80-86.
SHI Han, WU Min, XU Xue-wei, et al. Genetic analysis of partial sequences of the gene for halorhodopsin in halophilic archaea[J]. **J of Zhejiang University: Science Edition**,2008,35(1):80-86.

(责任编辑 涂红)