

新疆罗布泊地区可培养嗜盐古菌多样性及其功能酶筛选

刘冰冰^{1,2}, 唐蜀昆², 明红³, 何松涛², 聂国兴⁴, 关统伟¹, 张利莉^{1*}, 李文均^{2*}

¹ 塔里木大学生命科学学院, 新疆兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室, 阿拉尔 843300

² 云南大学省微生物研究所西南微生物多样性教育部重点实验室, 昆明 650091

³ 新乡医学院生命科学技术系, 新乡 453000

⁴ 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007

摘要 【目的】探索新疆罗布泊地区高盐环境可培养嗜盐古菌的多样性及其功能酶应用潜力。【方法】采集罗布泊地区 13 份土样, 用纯培养并结合基于 16S rRNA 基因系统发育分析的方法来研究样品中嗜盐古菌的多样性。按系统进化树的聚类关系, 挑选出一些菌株进行盐度耐受及淀粉酶、蛋白酶、酯酶的酶活检测。【结果】从 13 份土样中共分离到 56 株嗜盐古菌, 经 16S rRNA 基因克隆测序, 通过 MEGA 4.0 构建 N-J 树分析, 56 株菌分布于嗜盐古菌的 10 个生效发表属和 5 个潜在新属。运用 Shannon-Wiener 方法计算其多样性指数为 1.820。挑选 17 株嗜盐古菌所测试盐浓度实验结果表明这一批嗜盐古菌的大部分生长范围在 10%–35% 之间, 最适盐浓度在 20%–25% 之间。不同酶活检测结果为: 淀粉酶活率为 70.6%, 蛋白酶活率为 35.3%, 酯酶活率为 82.4%。【结论】新疆罗布泊周边地区由于气候及地理位置的独特性, 蕴藏丰富的嗜盐古菌资源。本实验所设计的分离方法对嗜盐古菌的分离是极其有效的, 为进一步研究新疆罗布泊及周边地区嗜盐古菌资源提供了技术基础。盐度耐受实验结果验证在低盐环境中分离嗜盐古菌新物种的可行性。同时, 嗜盐古菌的酶活比率较高且活性较强为进一步开发利用嗜盐古菌资源提供了理论依据。

关键词: 罗布泊, 嗜盐古菌, 多样性, 功能酶

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 09-1222-10

极端嗜盐古菌 (Extremely halophilic archaea) 是嗜盐微生物的一大类群, 其分类地位归属于古菌域 (Archaea)、广古菌门 (Euryarchaeota)、嗜盐菌纲 (Halobacteria)、嗜盐菌目 (Halobacteriales)、嗜盐菌科 (Halobacteriaceae)^[1]。目前已报道嗜盐古菌 35 个属 140 多个种 (截止 2011 年 4 月)。过去的报道中, 嗜盐古菌生长所需最低盐浓度不低于 1.5 mol/L, 但是在最近的研究中很多科学家在低盐环境中也发现了大量的嗜盐古菌新类群^[2-3]。因

此, 嗜盐古菌的分布范围非常广泛, 不仅包括高盐环境的盐湖、盐矿、盐场、腌制食品, 还包括一些低盐环境如海水、泉水、土壤等中。罗布泊位于塔里木盆地东部, 盆地中河流如塔里木河、孔雀河、车尔臣河、疏勒河等汇集于此, 曾经形成了巨大的湖泊, 是我国第二大咸水湖。但后来因人为因素影响而逐渐干涸, 表面形成的盐层厚度达 10 cm–100 cm。独特的地理环境和气候特征造就了极端高盐、干旱、强辐射的自然环境^[4]。目前所报道的对罗布泊可培养嗜盐

基金项目: 教育部新世纪优秀人才计划 (NCET-06-0917); 高等学校博士学科点专项科研基金 (200806730001)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-997-4682559, E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn; +86-871-5033335, E-mail: wjli@ynu.edu.cn

作者简介: 刘冰冰 (1987–), 河南南阳人, 硕士研究生, 从事嗜盐古菌资源及系统学研究。E-mail: liubingbing200666@163.com

收稿日期: 2011-03-02; 修回日期: 2011-05-15

古菌的多样性的研究很少,新疆师范大学的迪利拜尔·托乎提曾对罗布泊周边地区嗜盐菌进行研究,表明罗布泊周边地区蕴藏丰富的嗜盐古菌资源^[5]。本文采用纯培养的方法对新疆罗布泊周边地区的13个土样进行分离,并经16S rRNA基因测序并进行系统进化分析,对罗布泊周边地区的嗜盐古菌的多样性进行比较。按照系统进化树的不同分支类群挑选出17株嗜盐古菌进行耐盐浓度测试及酶活初筛,为从极端环境寻找新的微生物资源提供理论依据和实践指导。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品: 2009年11月从罗布泊周边地区采集土样13份,冰箱4℃保藏备用。按照系统发育树不同分类类群挑选17株嗜盐古菌作为盐浓度耐受实验材料。

1.1.2 培养基: ①分离培养基: 纤维素酪素复合盐培养基^[6] (CCMS): Microcrystalline cellulose 10 g, Casein 0.3 g, KNO₃ 2 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g, K₂HPO₄ 0.2 g, CaCO₃ 0.02 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, KCl 20 g, MgCl₂ 30 g, NaCl 100 g, agar 12 g, DW 1000 mL; ②改良ISP 5培养基: Yeast 5 g, K₂PO₄ 1 g, glycerin 1 g, KNO₃ 5 g, Asn 1 g, NaCl 100 g, agar 12 g, DW 1000 mL; ③改良高氏一号 (Gause 1) 培养基: Soluble starch 20 g, KNO₃ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, NaCl 180 g, agar 12 g, DW 1000 mL; ④腐殖酸 (HV) 培养基: Humic acid 1 g, Na₂HPO₄ 0.5 g, KCl 1.7 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, CaCl₂ 1 g, NaCl 100 g, agar 12 g, DW 1000 mL。以上培养基 pH 均调为 7.0 左右, 121℃、1 × 10⁵ Pa 灭菌 30 min。

碘液 (碘片 1 g, KI 2 g, DW 300 mL); Frazier 试剂 (HgCl₂ 15 g, 浓 HCl 20 mL, DW 100 mL)

1.1.3 主要试剂和仪器: 配制培养基试剂, 酶活检测实验中使用的可溶性淀粉、明胶、脱脂牛奶、吐温 (20, 40, 60, 80) 均为国产分析纯试剂; dNTPs、Taq 酶等购自上海生工生物工程技术有限公司; DNA Marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 连接试剂盒购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 37℃ 恒温培养箱购自上海精宏试验设备有限公司; 电泳仪

购自 Bio-Rad 公司; PCR 仪购自德国 Biometra 公司。

1.2 嗜盐古菌的分离与纯化

称取新鲜土样 2 g 放入装有 100 mL 10% 盐水三角瓶中震荡 1 h。采用梯度稀释法并最终稀释度至 10⁻³, 分别取 0.2 mL 均匀涂布于分离培养基上, 37℃ 黑暗条件下倒置培养 4 周。同一培养基上形态去重复, 描述并记录菌落的形态和个数。将分离到的菌株统一接种于改良 ISP4 培养基上, 待长出菌落后, 再将生长缓慢的菌株接种于改良高氏一号和 HMD 培养基上划出单一菌落, 挑选单一菌落进行划线纯化 3 次最终得到纯的菌落。分别用 20% 甘油管 (-80℃) 和牛奶管 (4℃) 进行保藏。

1.3 嗜盐古菌 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

基因组 DNA 的提取采用 Chelex 方法, 挑取少量菌体加入 50 μL 10% (pH 7.0) 的 Chelex-100, 在 PCR 仪中 99℃ 加热 20 min, 自然冷去后 12000 × g 离心 10 min, 取上清供 PCR 用。古菌通用引物^[7]: 正向引物 P1: 5'-ATTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3', 反向引物 P2: 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3'。PCR 反应体系: Buffer 5.0 μL, dNTP 4.0 μL, P1 1.0 μL, P2 1.0 μL, Taq 酶 0.3 μL, D. D. Water 37.7 μL, DNA Template 1.0 μL。扩增条件为: 95℃ 预变性 4 min; 95℃ 变性 1 min; 55℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 2 min。PCR 产物交由北京百泰克公司进行单向测序, 验证是嗜盐古菌再对扩增出来的条带胶回收后连接并转化到 *E. coli* JM109 中进行克隆, 克隆菌液交由北京百泰克公司进行测序。对所测的序列拼接去载体后利用 CLUSTAL X 软件比对^[8], 用 MEGA 4.0 软件采用 Neighbor-joining 法^[9] 基于 16S rRNA 基因序列构建系统进化树^[10]。

1.4 多样性分析

1.4.1 香农指数对多样性进行分析: 规定嗜盐古菌 16S rRNA 基因序列相似性 ≤ 98% 作为不同的分类单元^[11], 采用 Shannon-Wiener 指数^[12], 计算多样性。

$$H' = - \sum P_i \ln P_i$$

式中只属于种 i 的个体在全部个体中的比例。

1.4.2 根据不同样点对分离到的嗜盐古菌的多样性进行统计: 统计不同样点分离到的嗜盐古菌的种类及个数。

1.4.3 根据不同培养基对分离到的嗜盐古菌的多

多样性进行统计:统计不同培养基分离到的嗜盐古菌的种类及个数。

1.5 盐浓度耐受实验

1.5.1 选择做盐浓度实验的最适培养基:盐浓度实验主要是探究盐浓度的单一变化是否对嗜盐古菌生长产生影响,所以首先要确定除了盐浓度之外,培养基的其它组成成份是否会对嗜盐古菌的生长产生影响。选用改良高氏一号,HMD,CCMS培养基,这些培养基在分离和培养这一批嗜盐古菌的实验中已使用(培养中使用的盐浓度为20%,且嗜盐古菌在这一盐浓度上生长良好)。同时配置0%、20%两个浓度的培养基,在相同的条件下培养,若0%不长20%长则说明盐浓度是影响嗜盐古菌生长的单一因素。由于在0%上所有古菌都不长且在20%下生长周期短且长势较好,所以相对于其它培养基改良高氏一号可作为盐浓度耐受实验的基础培养基。

1.5.2 盐浓度耐受实验:在改良高氏一号培养基中添加NaCl使最终浓度为0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%(20%及以上盐浓度,培养基和盐要分开灭菌)。灭菌后倒板冷却。实验菌株分别接种于不同NaCl浓度的培养基中,37℃下黑暗条件下培养2周。观察菌株生长情况。

1.6 酶活检测

1.6.1 淀粉酶活检测:在最适培养基(NaCl 20%)中加入可溶性淀粉使最终浓度为0.5%,点接实验菌株,37℃下黑暗条件下培养两周,滴加1%的碘化钾溶液,观察水解圈有无。

1.6.2 蛋白酶活检测:①酪蛋白水解:最适培养基(NaCl 20%)和脱脂牛奶分开灭菌(脱脂牛奶115℃灭菌15 min),灭菌后两者混匀使脱脂牛奶的最终浓度为0.5%,点接实验菌株,37℃下黑暗条件下培养两周,观察水解圈有无。②明胶水解:最适培养基(NaCl 20%)中添加0.5%浓度的明胶,水浴加热使其溶化,115℃灭菌15 min。点接实验菌株于培养基上,37℃黑暗条件下培养两周。滴加Frazier试剂^[13],30 s后观察水解圈有无。③酯酶活性:最适培养基(NaCl 20%),吐温20、40、60、80分开灭菌,灭菌后两者混合使最终浓度为0.5%,混匀后倒板。点接实验菌株于培养基上,37℃下黑暗条件下培养两周。观察水解圈有无。

三大类酶活检测实验的最适培养基为HMD培养基,由于实验菌株都能在其上生长,且培养基透明度好,有利于水解圈的观察。

2 结果

2.1 嗜盐古菌多样性

2.1.1 构建N-J树并对可培养嗜盐古菌的多样性进行分析:从罗布泊及周边地区的13个土样中共分离到56株嗜盐古菌,土样信息如表1所示。克隆测序序列用EzTaxon server 2.1与生效发表种属进行比对(相似性比对结果及16S rRNA基因序列登录号如表2所示)。调集所有嗜盐古菌发表新属的典型菌株经Clustal X比对后构建近邻(N-J)树(如图1所示)。结果表明这56株古菌共分布于5个候选新属级类群[Group 1(包括菌株YIM 93606、YIM 93607、YIM 93756、YIM 93608、YIM 93680、YIM 93755、YIM 93598、YIM 93697、YIM 93680、YIM 93615、YIM 93671、YIM 93791、YIM 93696、YIM 93683、YIM 93790、YIM 93788、YIM 93789、YIM 93798),Group 2(包括菌株YIM 93737、YIM 93763、YIM 93694、YIM 93796、YIM 93699、YIM 93794、YIM 93762、YIM 93795、YIM 93605、YIM 93797),Group 3(包括菌株YIM 93589、YIM 93588),Group 4(YIM 93590),Group 5(YIM 93767)]和35个已知嗜盐古菌属的10个属(包括*Halopelagius*, *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Halalkalicoccus*, *Halopiger*, *Halodaptatus*, *Halorubrum*, *Natronococcus*, *Halosarcina*, *Halogenomonos*)。菌株的登录号如表2所示。

2.1.2 香农指数分析:从罗布泊及周边地区分离到的56株嗜盐古菌属于5个候选新属:Group 1含18株(32.1%),Group 2含9株(16.1%),Group 3含1株(1.8%),Group 4仅1株(1.8%),Group 5仅1株(1.8%)和其他已发表属:*Halopelagius*属2株(3.6%),*Natrinema*属1株(1.8%),*Haloterrigena*属13株(23.2%),*Halalkalicoccus*属2株(3.6%),*Halopiger*属1株(1.8%),*Halodaptatus*属1株(1.8%),*Halorubrum*属1株(1.8%),*Natronococcus*属1株(1.8%),*Halogenomonos*属2株(3.6%);*Halosarcina*属1株(1.8%)。以16S rRNA基因序列相似性小于或等于98%时作为不同分类单元进行多样性计算,上述56株嗜盐古菌可分为8个不同的分类单元,分别为Group 1有18株,Group 2有9株,Group 3有2株,Group 4有1株,Group 5有1株,*Halopelagius*属有2株,*Natrinema*属有1株,*Haloterrigena*属有2株,*Halodaptatus*属有1株。Shannon多样性指数(H')为1.820(Chao & Shen)^[14]。

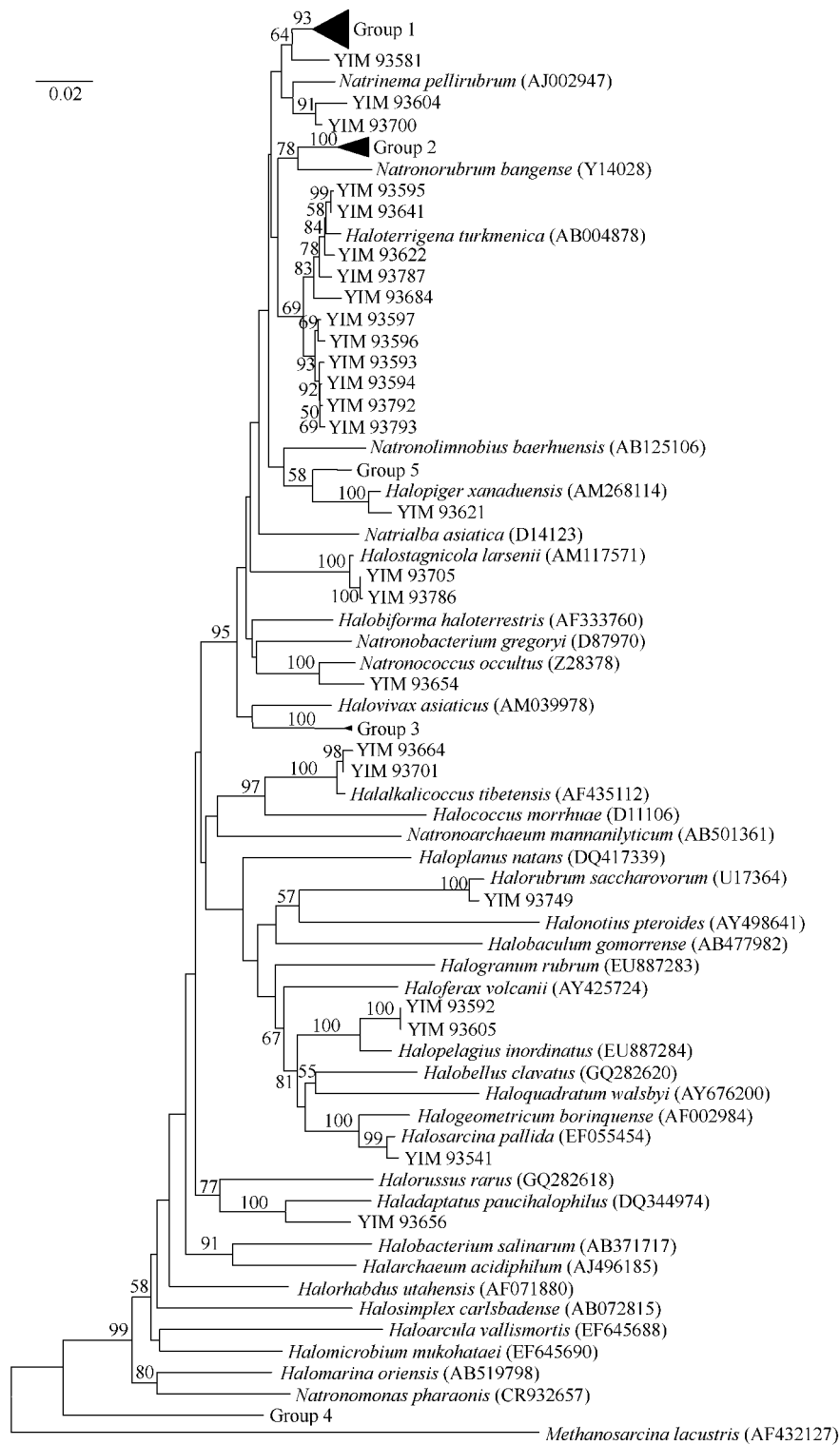


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育 N-J 树

Fig.1 Neighbour-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of *Halobacteriaceae*. Numbers at the nodes indicate the bootstrap values (> 50%) based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled datasets. GenBank accession numbers of the type strains of each genus are given in parentheses. Bar, 2% sequence divergence.

表 1 十三个土样的相关信息

Table 1 The related information of thirteen samples

Soil sample number	Sampling sites	Soil types	Altitude /m	Northern latitude	East longitude	pH	Salinity /%
1	140 km to Lup nur entrance(罗布泊入口 140 km 处)	Loam	782	39°56'104"	90°11'482"	6.5	3.5500
2	Surrounding of Loulan city (楼兰古城周边)	Loam	776	40°14'161"	90°16'712"	6.8	7.0400
3	Surrounding of Loulan city (楼兰古城周边)	Loam	914	41°28'464"	84°18'994"	7.5	3.6025
4	Surrounding of Loulan city (楼兰古城周边)	Solonchak	910	41°36'423"	84°46'619"	7.8	9.8050
5	Lup nur entrance(罗布泊入口处)	Solonchak	777	40°30'784"	90°18'418"	7.0	2.9475
6	130 km to Lup nur entrance (罗布泊入口 130 km 处)	Sandy soil	785	39°41'979"	89°54'496"	6.5	5.3400
7	140 km to Lup nur entrance (罗布泊入口 140 km 处)	Sandy soil	785	39°54'99"	90°9'281"	7.8	2.5950
8	Loulan city entrance(楼兰古城入口处)	Solonchak	782	39°58'723"	90°15'517"	7.0	1.9800
9	Surrounding of Loulan city (楼兰古城周边)	Sandy soil	775	40°23'812"	90°17'618"	6.5	13.9325
10	Surrounding of Loulan city (楼兰古城周边)	Clay	774	40°35'127"	90°18'491"	8.2	5.1350
11	15 km to Lup nur city(罗布泊镇 15 km 处)	Sandy soil	780	40°22'8"	90°52'3"	7.0	13.0150
12	Surrounding of Lup nur city (罗布泊镇周边)	Sandy soil	779	40°13'2"	90°37'9"	6.5	7.4050
13	Downtown of Lup nur city (罗布泊镇)	Solonchak	778	40°27'954"	90°52'63"	6.5	29.0250

2.1.3 根据不同样点对分离到的嗜盐古菌多样性 尤其是 2 号土样,分离到其他土样未分离到的新的进行统计:统计不同样点分离嗜盐古菌的种类。2, 属一级的分类单元,具体结果如表 2 所示。
3 4 5 号土样所分离到的嗜盐古菌的种类比较多,

表 2 13 个土样分离到的嗜盐古菌的种类,菌株数和 16S rRNA 基因菌株登录号

Table 2 Species, strain numbers and 16S rRNA gene sequence accession numbers of isolated halophilic archaeon strains from 13 soil samples

Soil samples number	Number of isolates	Accession number	Closest species	Number of each species	Similarity /%
1	YIM 93654	JF449415	<i>Natronococcus jeotgali</i>	1	99.241
	YIM 93701	JF449426	<i>Halalkalicoccus tibetensis</i>	1	99.457
	YIM 93656	JF449425	<i>Haladaptatus cibarius</i>	1	97.932
2	YIM 93792	JF449427	<i>Haloterrigena turkmenica</i>	4	98.167
	YIM 93793	JF449428	<i>Haloterrigena turkmenica</i>		98.099
	YIM 93684	JF449421	<i>Haloterrigena salina</i>	1	98.169
	YIM 93787	JF449388	<i>Haloterrigena salina</i>		98.521
	Group 5(YIM 93767)	JF449399	<i>Haloterrigena turkmenica</i>	1	96.667
	YIM 93541	JF449418	<i>Halosarcina pallida</i>	1	99.186
	YIM 93749	JF449434	<i>Halorubrum saccharovororum</i>	1	99.046
	Group 3(YIM 93588)	JF449414	<i>Halovivax ruber</i>	2	94.126
	YIM 93589)	JF449437	<i>Halovivax ruber</i>		94.271
	3	Group 4(YIM 93590)	JF449412	<i>Natronomonas pharaonis</i>	1
Group 1(YIM 93598)		JF449401	<i>Natrinema ejinorensense</i>	1	96.260
YIM 93705		JF449386	<i>Halostagnicola larsenii</i>	2	99.563
YIM 93786		JF449387	<i>Halostagnicola larsenii</i>		99.490
YIM 93594		JF449407	<i>Haloterrigena turkmenica</i>	6	98.167
YIM 93593		JF449416	<i>Haloterrigena turkmenica</i>		98.506
YIM 93597		JF449405	<i>Haloterrigena turkmenica</i>		98.235
YIM 93596		JF449413	<i>Haloterrigena turkmenica</i>		97.895
YIM 93595		JF449411	<i>Haloterrigena turkmenica</i>		99.117
YIM 93641		JF449417	<i>Haloterrigena turkmenica</i>		99.050

续表 2

Soil samples number	Number of isolates	Accession number	Closest species	Number of each species	Similarity /%
4	YIM 93592	JF449438	<i>Halopelagius inordinatus</i>	2	97.891
	YIM 93605	JF449439	<i>Halopelagius inordinatus</i>		97.861
	YIM 93664	JF449420	<i>Halalkalicoccus tibetensis</i>	1	99.254
	Group 1(YIM 93608)	JF449410	<i>Haloterrigena thermotolerans</i>	1	96.414
	Group 2(YIM 93794	JF449430	<i>Natronorubrum tibetense</i>	4	96.676
	YIM 93795	JF449435	<i>Natronorubrum tibetense</i>		96.472
	YIM 93762	JF449424	<i>Natronorubrum tibetense</i>		96.404
	YIM 93797)	JF449436	<i>Natronorubrum tibetense</i>		96.533
5	YIM 93621	JF449394	<i>Halopiger aswanensis</i>	1	98.764
	Group 1(YIM 93789	JF449391	<i>Natrinema ejinorensense</i>	8	96.754
	YIM 93696	JF449392	<i>Natrinema ejinorensense</i>		96.610
	YIM 93755	JF449398	<i>Natrinema ejinorensense</i>		96.048
	YIM 93680	JF449423	<i>Natrinema ejinorensense</i>		96.260
	YIM 93615	JF449403	<i>Natrinema ejinorensense</i>		96.189
	YIM 93756	JF449397	<i>Haloterrigena thermotolerans</i>		96.414
	YIM 93671	JF449419	<i>Natrinema ejinorensense</i>		96.471
	YIM 93689)	JF449400	<i>Natrinema versiforme</i>		96.240
	YIM 93581	JF449432	<i>Natrinema pallidum</i>	1	97.370
	Group 2(YIM 93699	JF449404	<i>Natronorubrum tibetense</i>	5	96.404
	YIM 93796	JF449431	<i>Natronorubrum tibetense</i>		96.676
	YIM 93737	JF449402	<i>Natronorubrum tibetense</i>		96.540
	YIM 93763	JF449441	<i>Natronorubrum tibetense</i>		96.540
	YIM 93694)	JF449422	<i>Natronorubrum tibetense</i>		96.608
	6	YIM 93604	JF449406	<i>Haloterrigena thermotolerans</i>	1
YIM 93788		JF449389	<i>Natrinema ejinorensense</i>	6	96.824
7	YIM 93798	JF449393	<i>Natrinema ejinorensense</i>		96.754
	YIM 93683	JF449440	<i>Natrinema ejinorensense</i>		96.895
	YIM 93790	JF449395	<i>Natrinema ejinorensense</i>		96.822
	YIM 93697	JF449390	<i>Natrinema ejinorensense</i>		96.613
	YIM 93791)	JF449496	<i>Natrinema ejinorensense</i>		96.613
	Nothing				
9	YIM 93700	JF449429	<i>Haloterrigena thermotolerans</i>	1	98.070
	YIM 93606	JF449408	<i>Haloterrigena thermotolerans</i>	2	96.692
10	YIM 93607)	JF449409	<i>Haloterrigena jeotgali</i>		96.726
	Nothing				
11	Nothing				
12	Nothing				
13	YIM 93622	JF449433	<i>Haloterrigena turkmenica</i>	1	99.185

2.1.4 根据不同培养基对分离到的嗜盐古菌的多样性进行统计: 比较 5 种培养基的分离情况, 发现改良 ISP5、HV 培养基在罗布泊及周边地区的土样分离中没有分离到嗜盐古菌。纤维素酪素复合盐培养

基共分离到 40 株嗜盐古菌, 分布于 9 个嗜盐古菌生效发表属和 4 个潜在的新属。改良高氏一号培养基共分离到嗜盐古菌 16 株, 分布于 2 个嗜盐古菌有效发表属和 2 个潜在新属。结果统计如表 3 所示。

表 3 四种培养基分离的嗜盐古菌种类及菌株数

Table 3 Species and number of isolated halophilic archaeon strains by four selective media

Media	The genera and number of isolation strains
CCMS	Group 1 (8), Group 2 (7), Group 3 (2), Group 4 (1), <i>Halostagnicola</i> (2), <i>Haloterrigena</i> (11), <i>Natronococcus</i> (1), <i>Haladaptatus</i> (1), <i>Halopelagius</i> (2), <i>Halosarcina</i> (1), <i>Halorubrum</i> (1), <i>Halalkalicoccus</i> (2), Group 5 (1)
Modified Gause 1	Group 1(10), Group 2(2), <i>Halopiger</i> (1), <i>Natrinema</i> (1), <i>Haloterrigena</i> (2)
HV	Nothing
Modified ISP5	Nothing

The number of each genera are given in parentheses.

2.2 盐浓度耐受实验结果

实验中所有的嗜盐古菌在 0% 的改良一号培养基上都不生长,5% 生长的有: YIM 93581, YIM 93664, 大部分嗜盐古菌的盐浓度生长范围在 10% - 35% 之间。详细结果见表 4。

盐浓度实验结果表明,选择用 10% 作为分离所用盐浓度,使得嗜盐古菌的盐浓度耐受范围得

到拓展。从表 4 可以看出大部分实验菌株在 10% 盐浓度上生长比较好,有的在 5% 的盐浓度上也能生长,说明大部分盐浓度的最低底线基本在 5% - 10% 之间,这与报道的大部分嗜盐古菌的最低盐浓度相比都低,扩大了嗜盐古菌分离盐浓度的底线范围,可能是能够较好地分离到大量嗜盐古菌的原因之一。

表 4 盐浓度耐受及酶活筛选结果

Table 4 The results of salt concentration tolerance and enzyme tests

Number of isolates	Range of NaCl concentration /%	Optimum NaCl concentration /%	Starch	Skim milk	Gelatin	Tween 20	Tween 40	Tween 60	Tween 80
YIM 93680	10 - 35	20 - 25	++	-	-	-	-	-	-
YIM 93581	5 - 35	20 - 30	+	-	-	+	-	-	-
YIM 93762	10 - 35	20 - 30	+++	-	-	++	+	+	-
YIM 93763	10 - 35	20 - 30	-	-	-	+++	++	-	-
YIM 93588	10 - 35	20 - 25	+	+	++	+	-	-	-
YIM 93589	15 - 35	20 - 25	+	++	++	++	-	-	-
YIM 93622	10 - 35	20 - 30	+++	-	-	++	-	-	-
YIM 93594	10 - 35	20 - 25	+	-	-	++	++	+++	-
YIM 93700	10 - 35	30	+	-	+	+++	++	-	-
YIM 93767	10 - 35	20	-	-	+	-	-	-	-
YIM 93621	15 - 35	20 - 25	-	-	+	-	-	-	-
YIM 93705	10 - 35	20 - 25	-	-	-	-	-	-	-
YIM 93654	10 - 35	20 - 25	+++	-	-	++	++	-	+
YIM 93664	5 - 35	20 - 30	-	-	-	+++	++	-	-
YIM 93749	10 - 35	20 - 30	++	-	-	-	+	+	-
YIM 93592	15 - 35	20	++	-	-	+	-	-	-
YIM 93656	10 - 35	20 - 25	+	++	+++	+++	++	++	-

Note: +: positive; ++: the higher positive; +++: the highest positive

2.3 酶活检测结果

2.3.1 淀粉酶活性: 17 株实验菌株中具有淀粉酶活性的菌株共有 12 株,酶活率为 70.6%。YIM 93654、YIM 93622、YIM 93762 具有很高的淀粉酶活性。

2.3.2 蛋白酶活性: 蛋白酶活性检测中我们选用了两种自然界中常见的蛋白质:酪蛋白和胶原蛋白水解物作为水解底物。在以往的实验中我们曾对比了干酪素和脱脂牛奶水解结果,发现两者无差别,由于脱脂牛奶配置培养基简单,且牛奶中酪蛋白占 80% 还有一些其他的蛋白质,使检测的范围扩大,所以本实验就用脱脂牛奶而不是干酪素来作为水解底物。只要有任何一种蛋白酶有活性本实验都记录为具有蛋白酶活性。17 株实验菌株中具有蛋白酶活性的有 6 株,酶活率为 35.3%。其中,菌株 YIM 93656 具有很高的蛋白酶活性。

2.3.3 酯酶活性: 吐温 20,40,60,80,代表具有不

同类型的酯类,只要有一种酯酶有活性本实验都将其标记为具有酯酶活性。17 株实验菌株中具有酯酶活性的有 14 株,酶活率为 82.4%。YIM 93700、YIM 93594、YIM 93664、YIM 93763、YIM 93656 具有很高的酯酶活性。由于是按照系统发育树的不同分类群挑选,酶学活性初探表明这一批嗜盐古菌中的酶学活性是比较丰富的。菌株 YIM 93581、YIM 93762、YIM 93622、YIM 93594、YIM93749、YIM 93592, YIM 92654 具有双阳性;菌株 YIM 93588、YIM 93589、YIM 93700、YIM 93656 具有三阳性。酶活检测结果如表 4 所示。

3 分析讨论

本实验分离到众多嗜盐古菌新物种,新物种率达到 67.9%。新物种率较高主要由于以下几方面的原因:客观原因是采样地点的特殊性。本实验所

采集土样的地点是罗布泊地区,那里人烟罕及,过去曾是湖泊富集区,但后因人为因素使环境恶化加之表面蒸发大降水少最终导致湖水干涸形成巨大的盐壳,在盐壳下面是原来湖底的沉积泥沙。独特的气候地理特征和人类活动干扰小使得这里蕴含有丰富的未被发现的嗜盐微生物资源。这是我们分出这么多嗜盐古菌新物种的首要前提。主观原因:首先本实验有针对性地对嗜盐古菌的分离方法做了较多的改进甚至于全新的尝试。以往大多数分离嗜盐古菌的培养基都选用 Yeast extract, Casimina acid 作为有机能源物质,本实验所选用的能源物质主要是淀粉、微晶纤维素、干酪素、酵母粉和腐植酸。目的在于利用这些新的能源物质分离到一些不常见的新物种。由于嗜盐放线菌和嗜盐古菌的生存环境比较相似, CCMS、改良 ISP5 和腐植酸培养基在以往分离实验放线菌中的分离效果较好,所以就选用这些培养基来分离嗜盐古菌。实验结果表明 CCMS 培养基共分离到 8 个已发表属和 5 个潜在新属,其分离效果很好,对于以后尝试改良 CCMS 培养基分离更多嗜盐古菌提供了技术支持。改良高氏一号培养基中高浓度淀粉对嗜盐古菌的分离效果较好。但是改良 ISP5 和腐植酸培养基没有分离到嗜盐古菌,原因可能是较高含量的酵母粉和腐植酸的存在不利于本次所选择点嗜盐古菌的分离。其次,大部分土样盐度小于 10%,考虑以往大多数文献中报道嗜盐古菌的分离盐浓度在 15% 以上^[14-16]以及大多数嗜盐古菌的最适盐浓度在 15% 以上^[1],若以 15% 以上盐浓度分离,多数嗜盐古菌可能会由于盐浓度适宜使生长导致密度过大或优势菌群数量过多会影响多样性分离结果。为了探讨在低于 15% 盐浓度下能否分离到新的嗜盐古菌类群,本实验选择 10% 作为分离盐浓度。分离嗜盐古菌的多样性结果证明所采用的在低浓度下筛选分离嗜盐古菌新物种的方法对于嗜盐古菌的多样性分离有一定作用。这为以后的实验中尝试用更低的盐浓度分离嗜盐古菌新物种做了很好的预实验。同时,选用黑暗条件下培养,主要是考虑所采集的样品都是低于地表或盐盖 10 cm - 30 cm 的土样,这里常年处于黑暗环境;另外避免光照供养从而增强培养基化能供养的选择性。实验结果表明,本实验分离到大量嗜盐古菌的新物种,对于以后尝试用其他能源物质、不同盐浓度及一些选择性处理方法来分离嗜盐古菌提供了实验数据支持。

本实验所分离的嗜盐古菌的新种率为 67.9%、分布于 35 个已知嗜盐古菌中的 10 个和 5 个候选新属,所得到的新种多样性还是比较丰富的。但是用香农指数来描述多样性其值并不高仅为 1.820。同一种属的重复菌株太多,从 N-J 树上可以看出分离到的新物主要集中于 Group 1 和 Group 2 两个分枝上,占新种的 73.7%。由此看出在本实验的多样性结果具有不均一性,即在个别种属的菌株数量过多。可能的原因有:一,所选用样品中 Group 1 和 2 可能是优势菌群;二,所采用的实验方法的选择性,即所选用的培养基,10% 盐浓度及黑暗培养的这些分离方法更有利于 Group 1 和 2 两个类群的生长。另外,从表 2 统计不同土样对嗜盐古菌分离结果来看,某些土样分出嗜盐古菌种类较少或没有,而有些土样分出的菌株多集中于某一属致使整体分离嗜盐古菌的多样性降低。如 8、11、12 号土样未分出嗜盐古菌;6、7、9、11、13 号土样分出的嗜盐古菌种类较单一。出现这种现象的原因有:一,土样的盐浓度较低或者较高,其中的某些菌群不能在 10% 的盐浓度上生存;二,由于砂土所含有有机质和水分较少,可能其中所含的微生物数量较少;三,所设计的培养基具有选择性,不利于嗜盐古菌的其他类群的生长。香农指数不高,说明样品中嗜盐古菌的多样性具有很大发掘潜力,需要我们不断改进思路设计:采用不同碳氮源及离子组分的培养基及平行使用多种分离方法(不同盐浓度;黑暗和光照同时培养等),尽量减少由于人为因素对分离嗜盐古菌多样性所造成的影响,从而分离出多样性更为丰富的嗜盐古菌类群。

从 56 株嗜盐古菌中按系统发育树的不同分类类群挑选出 17 株嗜盐古菌对其盐浓度耐受和酶活进行检测。盐浓度耐受实验结果表明这一批嗜盐古菌的生长范围大部分在 10% - 35% 之间,最适盐浓度在 20% - 25% 之间。酶活检测的结果表明,这一批嗜盐古菌中具有丰富的酶活特性而且部分菌株的酶活特性较高。有些菌株的酶活特性还表现出双阳性甚至三阳性。嗜盐古菌所生存的环境中有机质是很贫乏的,尤其是本次实验所选用的土样位于罗布泊地区,但是从这里分离的嗜盐古菌却具有不同酶活特性。首先,可能是受人为因素影响使所配置培养基的底物具有一定筛选作用。其次,可能是由于罗布泊未干涸时,湖水中的有机质比较丰富,嗜盐古菌会分解这些有机质来生存。湖水干涸后虽然有机

质相对匮乏,但是嗜盐古菌仍然保留了分解有机质的功能,所以当给它们提供适宜的有机质时,这种分解的功能就被活化。最后,可能是由于嗜盐古菌生存环境的恶劣,所以才需具备不同的酶活特性,以便能利用复杂多变的环境中微量的有机质生存。总之,挑选出来的菌株基本上都具有淀粉酶,蛋白酶,酯酶活性的一种或几种,初步判断这一批嗜盐古菌的酶活特性较丰富,说明不同类型的嗜盐古菌在酶学应用方面具有很大潜力。

本实验从纯培养的角度出发,尝试用改良方法的分离方法分离到大量嗜盐古菌新物种,酶学特性的初探,发现嗜盐古菌在工业酶应用上具有一定的潜力,充分表明罗布泊地区中富含丰富的嗜盐古菌资源有待于我们进一步的发掘和利用。

参考文献

- [1] Grant WD , Kamekura M , McGenity TJ , Ventosa A. Class III. *Halobacteria* class. nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. New York: Springer Verlag Press ,2001 ,1: 294-334.
- [2] Purdy KJ , Cresswell-Maynard TD , Nedwell DB , McGenity TJ , Grant WD , Timmis KN , Embley TM. Isolation of haloarchaea that grow at low salinities. *Environmental Microbiology* ,2004 ,6: 591-595.
- [3] Elshahed MS , Najar FZ , Roe BA , Oren A , Dewers TA , Krumholz LR. Survey of archaeal diversity reveals an abundance of halophilic Archaea in a low-salt , sulfide- and sulfur-rich spring. *Applied and Environmental Microbiology* ,2004b ,70: 2230-2239.
- [4] 罗超,彭子成,杨东,刘卫国,贺剑锋,刘桂建. 新疆罗布泊地区的环境演化. 自然杂志(*Chinese Journal of Nature*) ,2006 ,28(1) : 37-41.
- [5] 迪利拜尔·托乎提,旭格拉,穆尔特扎,热则宛古丽,阿曼古丽,纪婷,迪丽乌孜. 新疆罗布泊地区极端环境嗜盐菌的研究. 生物多样性(*Biodiversity Science*) ,2009 ,19(5) : 16-19.
- [6] Tang SK , Tian XP , Zhi XY , Cai M , Wu JY , Yang LL , Xu LH , Li WJ. *Haloactinospora alba* gen. nov. , sp. nov. , a halophilic filamentous actinomycete of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,2008 ,58: 2075-2080.
- [7] 王振雄,徐毅,周培瑾. 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*) ,2000 ,40(2) : 115-120.
- [8] Thompson JD , Gibson TJ , Plewniak F , Jeanmougin F , Higgins DG. The CLUSTAL _ X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* ,1997 ,25: 4876-4882.
- [9] Saitou N , Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* ,1987 ,4: 406-425.
- [10] Tamura K , Dudley J , Nei M , Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0. *Molecular Biology and Evolution* ,2007 ,24: 1596-1599.
- [11] Rees HC , Grant WD , Jones BE , Heaphy S. Diversity of Kenyan soda lake alkaliphiles assessed by molecular methods. *Extremophiles* ,2004 ,8: 63-71.
- [12] Hill TCJ , Walsh KA , Harris JA. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *Federation of European Microbiological Societies Microbiol Ecology* ,2003 ,43: 1-11
- [13] McDade JJ , Weaver RH. Rapid methods for the detection of gelatin hydrolysis. *Journal of Bacteriology* ,1959 ,77: 60-64.
- [14] Chao A , Shen TJ. Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. *Environmental and Ecological Statistics* ,2003 ,10: 429-443.
- [15] Castillo AM , Gutierrez MC , Kamekura M , Xue Y , Ma Y , Cowan DA , Jones BE , Grant WD , Ventosa A. *Halostagnicola larsenii* gen. nov. , sp. nov. , an extremely halophilic archaeon from a saline lake in Inner Mongolia , China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,2006b ,56: 1515-1517.
- [16] Castillo AM , Gutierrez MC , Kamekura M , Ma Y , Cowan DA , Jones BE , Grant WD , Ventosa A. *Halovivax asiaticus* gen. nov. , sp. nov. , a novel extremely halophilic archaeon isolated from Inner Mongolia , China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,2006a ,56: 765-770.
- [17] Bardavid RE , Mana L , Oren A. *Haloplanus natans* gen. nov. , sp. nov. , an extremely halophilic , gas-vacuolate archaeon isolated from Dead Sea-Red Sea water mixtures in experimental outdoor ponds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,2007 ,57: 780-783.

Biodiversity and functional enzymes of cultured halophilic archaeon in Lop Nur region

Bingbing Liu^{1 2}, Shukun Tang², Hong Ming³, Songtao He¹, Guoxing Nie⁴, Tongwei Guan¹, Lili Zhang^{1*}, Wenjun Li^{2*}

¹ Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin of Xinjiang Corps, College of Life Science, Tarim University, Alar 843300, China

² Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China

³ Department of Life Sciences and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

⁴ College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract [Objective] In order to explore the diversity of cultured halophilic archaeon from hypersaline environments in Lop Nur region and their potential application. **[Methods]** Total 13 soil samples were collected from Lop Nur regions. Halophilic archaea strains were isolated and identified by 16S rRNA gene sequence analysis. In addition, 17 strains were selected based on different branches in phylogenetic tree, and their salt concentration tolerance and amylase, protease, esterase activities were further detected by conventional methods. **[Results]** The 16S rRNA gene sequences of 56 selected strains were determined, and the phylogenetic analysis was carried out. These strains were classified into 10 known genera and 5 new potential genera, and the Shannon index was 1.820. The range of salt concentration tolerance of most strains was 10% – 35% (optimum at 20% – 25%). Amylase positive rate was 70.6%, protease positive rate was 35.3% and esterase positive rate was 82.4%. **[Conclusion]** Diverse halophilic archaeon were discovered in Lop Nur regions. The isolation methods that we used were successful for isolating halophilic archaeon from these areas, which provided the technical basis to future explore the resources of halophilic archaeon in Lop Nur regions.

Keywords: lop nur, halophilic archaeon, culture-dependent, microbial diversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the New Century Excellent Talents in University (NCET-06-0917) and by the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (200806730001)

* Corresponding authors. Tel: +86-997-4682559, E-mail: zhang63lyly@yahoo.com.cn; +86-871-5033335, E-mail: wjli@ynu.edu.cn

Received: 2 March 2011 / Revised: 15 May 2011