

# 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌的 16S rDNA PCR-RFLP分析\*

曾 静 窦岳坦 杨苏声

(中国农业大学生物学院微生物系 北京 100094)

**摘要:** 对来自新疆地区艾丁湖、艾比湖和玛纳斯盐湖等盐湖的 28 株中度嗜盐菌与 9 株相关的参比菌株, 进行了 16S rDNA PCR-RFLP 分析, 这些菌株是革兰氏阴性杆菌, 能在 0~25%NaCl 中生长。在实验中, 选用 4 种限制性内切酶 *AluI*、*HinfI*、*RsaI* 和 *HaeIII*, 将供试菌株的 16S rDNA 的 PCR 产物进行酶切, 用 3% 的琼脂糖电泳分析酶切产物。结果表明, 在 74% 的相似性水平上分为 3 群。群 I 包括新分离的菌株 C1 和参比菌株死海色盐杆菌 (*Chromohalobacter marismortui*) 和 *Nesterenkonia halobia*; 群 II 包括伸长盐单胞 (*Halomonas elongata*) 在内的 7 株参比菌株和 8 株新分离的菌株; 群 III 包括 19 株新分离的菌株。

**关键词:** 中度嗜盐菌, 新疆地区, 盐湖, 16S rDNA PCR-RFLP

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654(2000)05-0327-04

## 16S rDNA PCR-RFLP ANALYSIS OF MODERATELY HALOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM SALT LAKES IN XINJIANG REGION

ZENG Jing DOU Yue-Tan YANG Su-Sheng

(Department of Microbiology, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094)

**Abstract:** Twenty-eight moderately halophilic bacteria isolated from salt lakes in Xinjiang Regions were analyzed

\* 国家自然科学基金资助项目

收稿日期: 1999-08-10, 修回日期: 2000-01-30

by 16S rDNA PCR-RFLP in comparison with nine reference strains of related species. The 16S rRNA PCR products of the tested stains were digested by four restriction enzymes (*AluI*, *HinFI*, *RsaI* and *HaeIII*). The results showed that all tested strains were clustered into three groups at 74% similarity level. Group I included 2 reference strains *Chromohalobacter marismortui*, *Nesterenkonia halobia* and new isolate C1. Group II included seven type strains belonging to *Halomonas* and eight new isolates. Group III included nineteen new isolates.

**Key words:** Morderasterly halophilic bacteria, Xinjiang region, Salt lake, 16S rDNA PCR-RFLP

中度嗜盐菌,也称为极端耐盐菌,不是分类学上的名词,它们生长在盐湖、盐场、盐碱地和盐腌食品等极端环境,是一群不同于古菌,而且能在含有 0~15% NaCl 的环境中生长的细菌,有些菌株可以在 5%~25% NaCl 的范围内生长。它们是由不同属的细菌组成的异源生理类群,凡是能耐高盐浓度的细菌都归属到这个类群中<sup>[1]</sup>。在二十世纪八十年代,中度嗜盐菌的分类还很混乱,只有 *Halomonas* 被认为是唯一的中度嗜盐菌属,其中唯一的种是由 Vreeland 从晒盐池中发现的,定名为 *Halomonas elongata*<sup>[2]</sup>。后来,许多中度嗜盐菌被归入其它的属,如德莱氏菌属 (*Deleya*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 等<sup>[3]</sup>。随着中度嗜盐菌分类工作的进展,许多相关的种被归入相应的科和属<sup>[4~8]</sup>。1996 年 Dobson<sup>[9]</sup> 根据 16S rRNA 的全序列分析将盐单胞菌属、德莱氏菌属和盐弧菌属归入盐单胞菌属。目前,中度嗜盐菌有一个科 Halomonadaceae,其中包括两个属,即 *Halomonas* 和发酵细菌属 (*Zymobacter*),前者有

19 个种, 后者只有一个种棕榈发酵细菌 (*Z. palmae*)。新疆地区有着非常特殊的地理环境和气候条件,蕴含着丰富的菌种资源。本研究以新疆地区的艾丁湖、艾比湖、盐湖、乌棕湖和达板湖为工作重点,分离纯化了 28 株能耐受 0~25%NaCl 的革兰氏阴性中度嗜盐杆菌,与引进的 9 株包括 *Halomonas elongata* 在内的参比菌株一起,进行了 16S rDNA PCR-RFLP 分析。

1 材料与方法

1.1 菌株的分离和纯化

采集盐土,将 1g 土样置于 100mL Gibson<sup>[2]</sup> 液体培养基中。在 30℃、120r/min 摇床培养 3~5d,富集菌体。将培养液稀释到 10<sup>-6</sup>,取适当稀释度的菌液 0.1mL 涂布在含有 20%NaCl 的 Gibson 平板上,于 30℃ 培养 5d,挑取菌落进行分离纯化,得到纯培养。

1.2 参比菌株

7 株引自德国菌种 DSMZ 保藏中心,2 株由复旦大学徐德强惠赠(见表 1)。

表1 参比菌株一览表

编号	菌名	菌号	来源
3	<i>Halomonas meridiana</i>	246	复旦大学
5	<i>Halomonas elongata</i>	35	复旦大学
6	<i>Chromohalobacter marismortui</i>	6770	DSMZ
7	<i>Nesterenkonia halobia</i>	20541	DSMZ
19	<i>Halomonas cupida</i>	4740	DSMZ
29	<i>Halomonas aquamarina</i>	4739	DSMZ
30	<i>Halomonas marina</i>	4741	DSMZ
31	<i>Halomonas aquamarina</i>	30161	DSMZ
32	<i>Halomonas venusta</i>	4743	DSMZ

1.3 16S rDNA PCR-RFLP分析

1.3.1 菌体培养与收集:将纯培养物接种于 100mL Gibson 液体培养基中,培养至对数期,

在 4000r/min,离心 5min 收集菌体。总 DNA 提取、PCR 反应方法、酶切及琼脂糖凝胶电泳方法见文献 [10]。

1.3.2 结果处理,根据条带的有无,记为“1”和“0”,采用 Mints 软件,选用简单匹配相似数 (Ssm) 及平均连所锁聚类方式 (UPGMA) 聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 供试菌株

从新疆地区盐湖等处共采集和分离了 28

表2 供试菌株一览表

编号	菌号	来源	编号	菌号	来源
1	C1	达板湖	20	S	盐湖
2	C2	达板湖	21	YH-1	盐化厂
4	C6	盐化厂	22	YH-2	盐化厂
8	Ia	艾丁湖	23	YH-3	盐化厂
9	II2	艾丁湖	24	YH-4	盐化厂
10	ID1	艾比湖	25	AI-1	艾丁湖
11	ID2	艾比湖	26	AI-3	艾丁湖
12	ID3	艾比湖	27	AI-4	艾丁湖
13	ID4	艾比湖	28	WB-1	乌棕湖
14	ID6	艾比湖	33	YI-4	艾丁湖
15	AD-1	艾丁湖	34	YI-5	艾丁湖
16	AD-2	艾丁湖	35	YI-6	艾丁湖
17	AD-6	艾丁湖	36	YI-7	艾丁湖
18	DB-1	达板湖	37	YI-8	艾丁湖

株供试菌,列于表 2。

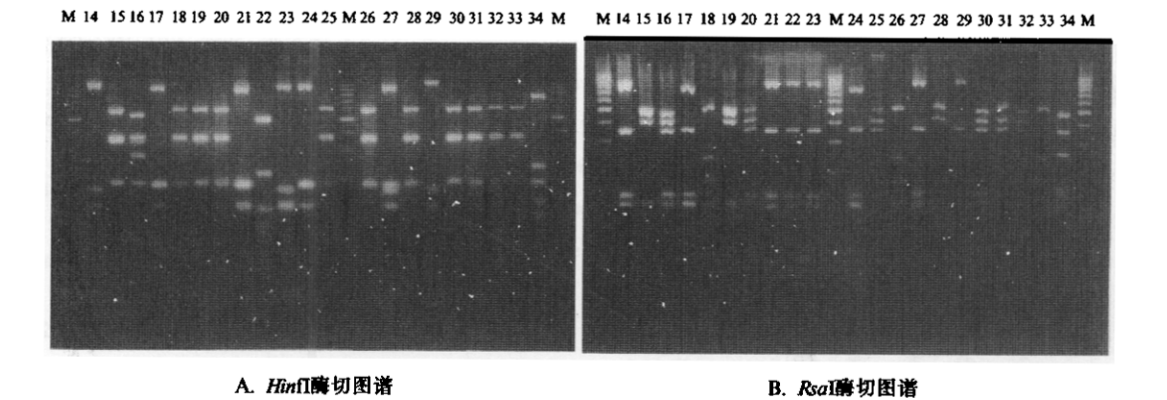
2.2 16S rDNA PCR-RFLP分析的酶切电泳图谱

在酶切图谱中,4 种限制性内切酶 *Hinf*I(识别位点: -G ANTC-)、*Hae*III(识别位点: -GG CC-)、*Alu*I(识别位点: -GA TC-)和 *Rsa*I(识别位点: -TG CA-), *Alu*I、*Rsa*I 和 *Hae*III 对所有的供试菌株都具有良好的特异性, *Hinf*I 的带型较少。图 1 表示部分菌株的酶切电泳图谱。从图 1 可以看出,标准菌株之间的带型,以及标准菌株与分离自新疆的菌株之间的带型有较大的区

别,这说明了分离自新疆地区的中度嗜盐菌存在着丰富的多样性。

2.3 聚类结果的分析

从聚类结果看(图 2),在 74% 的相似性水平上,分成 3 个群,即群 I、群 II 和群 III,群 I 包括新分离的菌株 C1 和参比菌株 *Chromohalobacter marismortui* 与 *Nesterenkonia halobia*,群 II 包括 6 株参比菌株,即 *Halomonas elongata*、*Halomonas cupida*、*Halomonas aquamarina*、*Halomonas maridiana*、*Halomonas venusta* 和 *Halomonas meridiana*,以及 8 株新分离的菌株,即 ID6、YI-4、



A. *Hinf*I酶切图谱

B. *Rsa*I酶切图谱

图1 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌16S rDNA PCR-RFLP酶切电泳图谱

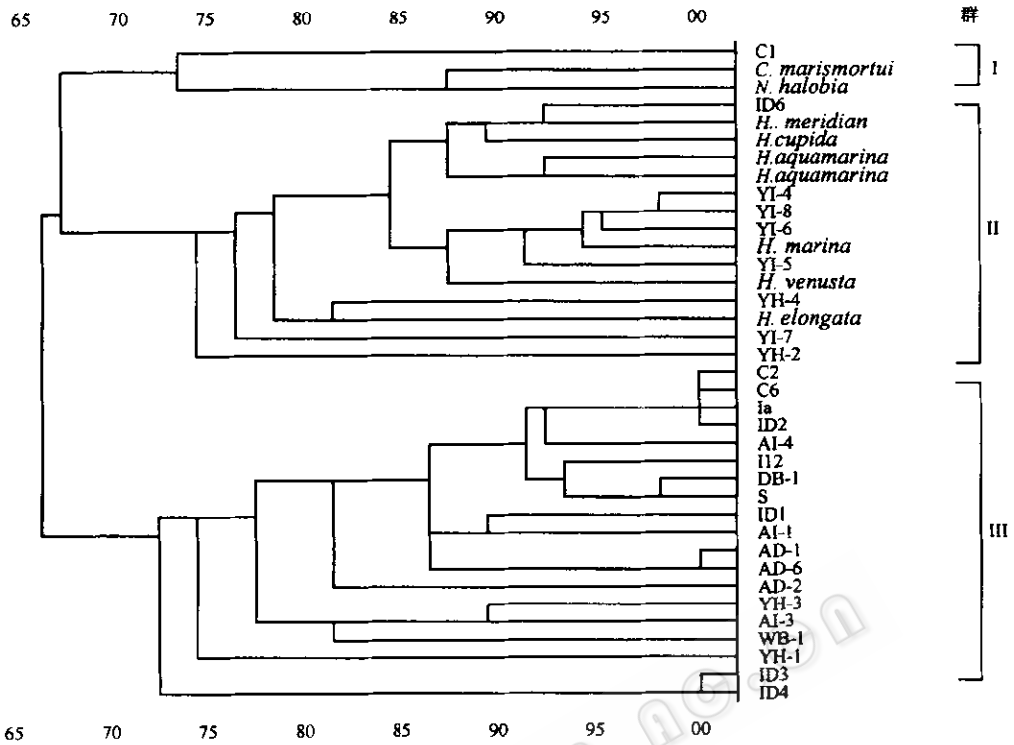


图2 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌16S rDNA-RFLP的聚类图谱

YI-5、YI-6、YI-7、YI-8、YH-2和YH-4。群III包括19株新分离菌株，C2、C6、Ia、ID2、AI-4、II2、DB-1、S、ID1、AI-1、AD-1、AD-6、AD-2、YH-3、AI-3、WB-1、YH-1、ID3和ID4。

从上述分群的结果可以看出，所有 *Halomonas* 的参比菌株都聚在同一群内，即群II。这与1996年Dobson<sup>[9]</sup>对盐单胞菌属、德莱氏菌属和盐弧菌属的16S rRNA的全序列分析结果是一致的<sup>[9]</sup>，也说明本研究所获得的结果是可信的。群III全部为新分离的菌株，表明新疆地区盐湖的中度嗜盐菌是独特的类群，有可能是新分类单元，这有待于通过数值分类和DNA-DNA杂交进一步分析。通过16S rDNA PCR-RFLP技术对新疆地区盐湖的中度嗜盐菌进行分析，证明该技术是一种简单、快速和有效的分群方法。

### 参 考 文 献

- [1] LeFevre E, Round L A. J. Bacteriol, 1919, 4:177~182.
- [2] Russell H. Vreeland. Genus Halomonas. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.) Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984, 234~256.
- [3] Ramos-Cormenzana, A. Ecological distribution and biotechnological potential of halophilic microorganisms. In M. S. Da Costa, J. C. Duarte, and R. A. D. Williams (ed.), Microbiology of extreme environments and its potential for biotechnology. Elsevier Applied Science, London, United Kingdom. 1989, 289~309.
- [4] Peter. D. Franzmann, Uta Wehmeyer, and Erko Stackebrandt, System. Appl. Microbiol. 1988, 11:16~19.
- [5] Hansel J. Huval, and R. H. Vreeland. Can. J. Microbiol. 1995, 41:1124~1131.
- [6] Ana M. H. Vreeland. R. H. Int. J. Syst. Bacteriol. 1987, Vol. 37, 4:347~350.
- [7] Linda Baumann. Ron D. B. And Paul B., Int. J. Syst. Bacteriol. 1983, 33(4):793~802.
- [8] Dobson. S. J. Int. J. Syst. Bacteriol. 1990, 13:270~278.
- [9] Dobson S. J. Franzmann. P. D. Int. J. Syst. Bacteriol. 1996, 46(2):550~558.
- [10] 闫爱民, 陈文新. 高技术通讯, 1998, 8(9): 50~54.