

耐热嗜盐菌的分离及 16S rRNA 基因序列分析

谢莹 林连兵 季秀玲 魏云林*

(昆明理工大学生物工程技术研究中心 昆明 650224)

摘要: 从位于西藏自治区澜沧江边一个 47℃ 的盐井中分离筛选到一株耐热嗜盐菌菌株 YJ0238, 对其进行了生理生化特性研究, 采用 PCR 方法扩增其 16S rRNA 基因序列, 并进行了测定。基于生理生化特性和 16S rRNA 基因序列的同源性比较, 以及系统发育分析, 发现菌株 YJ0238 是 *Idiomarina* 属中成员 *zobellii* 的一个亚种, 其 16S rRNA 基因序列已被 GenBank 数据库收录, 序列号为 EF693953。迄今为止, 国内极少有关高温、高盐环境中微生物研究的报道, 本研究可为今后研究同类极端环境中新的物种资源以及微生物多样性提供素材和参考。

关键词: 耐热嗜盐菌, 16S rRNA 基因序列, 系统发育

Isolation and 16S rRNA Gene Sequence Analysis of a Thermotolerant Halophilic Bacterium

XIE Ying LIN Lian-Bing JI Xiu-Ling WEI Yun-Lin*

(Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224)

Abstract: A strain of thermotolerant halophilic bacteria YJ0238 was isolated from the salt well at 47℃ in the Kangning countryside where was located at the side of Lancang River in the Tibet Autonomous Region. Some physiological and biochemical properties were characterized. 16S rRNA gene sequence of YJ0238 was amplified by PCR, and its nucleotide sequence was determined. Based on its physiological and biochemical properties, homology and phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence, strain YJ0238 was identified as a subspecies of the species *Idiomarina zobellii*. The GenBank accession number of the 16S rRNA gene sequence of strain YJ0238 is EF693953. Until now, there were few reports on the study of high-temperature and high-salt microbial in domestics. The results of this study will provide research material and information for further studies in this area.

Keywords: Thermotolerant halophilic bacteria, 16S rRNA gene sequence, Phylogeny

嗜盐菌是指能在高盐环境下生长的细菌, 它主要生长在盐湖、死海、盐场等浓缩海水中以及一些盐制品上。根据其对盐的嗜耐程度, 可分为非嗜盐菌(最适生长盐浓度<2%); 弱嗜盐菌(最适生长盐浓

度为 2%~5%), 多数海洋微生物属于这个类群; 中等嗜盐菌(最适生长盐浓度为 5%~20%)和极端嗜盐菌(最适生长盐浓度>15%~30%), 其中部分极端嗜盐菌为嗜盐古菌^[1]。嗜盐菌种类繁多, 它们的分类

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金

* 通讯作者: Tel: 0871-3801018-205; Fax: 0871-3801191; ✉: weiyunlin@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-06-23; 接受日期: 2007-09-01

主要依据 3 方面:表型特征、化学分类数据和分子生物学数据^[2]。嗜盐菌作为一类新型的、极具应用前景的微生物资源,近年来受到广泛关注,它们具有极为特殊的生理结构和代谢机制,同时还产生了许多具有特殊性质的生物活性物质,其嗜盐机理也进行了深入的研究^[3,4]。

迄今为止国内极少关于耐热嗜盐菌研究的报道,国外研究的也较少^[5,6],但已经分离到嗜热嗜盐菌的新种。耐热嗜盐菌的菌种资源、生理生化 and 遗传特性都具有研究和利用价值。因此本研究从位于低纬度的西藏自治区澜沧江边康宁镇的一个 47℃ 盐井中分离得到了一株耐热嗜盐菌菌株,将其部分生理生化特性同 *Idiomarina* 属中成员 *zobellii* 进行比较,并对其进行了 16S rRNA 基因序列的测定和系统进化分析,发现菌株 YJ0238 是 *Idiomarina* 属中成员 *zobellii* 的一个亚种。采用细菌的生理生化特征和 16S rRNA 基因序列这一有效分子指标进行细菌分类的初步鉴定和系统进化树的构建,可以了解这株耐热嗜盐菌的分类学地位及部分生物学性质。

1 材料与方法

1.1 培养基

培养基 A:氯化铵 0.1 g,磷酸二氢钾 0.3 g,磷酸氢二钾 0.3 g,氯化镁 0.2 g,氯化钙 0.2 g,乙酸钠 0.5 g,酵母提取物 1 g,胰蛋白胨 1 g,氯化钠 100 g,100 倍微量元素液 1 mL,pH7.5,定容至 1 L,固体培养基加琼脂 20 g,用于嗜盐菌的分离和培养。

培养基 B:氯化钠 10 g,酵母提取物 5 g,胰蛋白胨 10 g,pH 自然,定容至 1 L,1×10⁵ Pa 灭菌 20 min 后补加适量浓度的氨苄青霉素,固体培养基加琼脂 20 g,用于氨苄抗性的检测。

1.2 样品采集和菌株分离

样品采自西藏自治区一个 47℃ 的盐井,这个盐井位于澜沧江边(N29°02',E98°35'),盐浓度为 7%,pH 为 6.5,水样及土样经稀释后涂布平皿,在 47℃ 的培养箱中培养 2 d,通过划线法进一步分离纯化,得到一株耐热嗜盐菌菌株 YJ0238。

1.3 生理生化特性研究

1.3.1 耐盐和温度试验:将菌株 YJ0238 于不同盐浓度和不同温度的培养基中培养 10 d,观察其生长情况。

1.3.2 其它生理生化试验:生理生化特性的选择主要根据相应属、种鉴定的相关文献进行,方法参考《伯

杰细菌鉴定手册》及《微生物学实验》中的方法^[7,8]。

1.4 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增

扩增 16S rRNA 基因序列的两端引物按照 Lane (1985)^[9]设计:正向引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和反向引物:5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3'。PCR 反应体系为 25 μL,反应条件为 94℃ 变性 4 min;接下来进行 30 个循环反应:94℃ 变性 45 s,50℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 90 s;然后 72℃ 再延伸 10 min,最后于 4℃ 保存。

1.5 扩增产物的克隆及序列测定

PCR 产物用 Invitrogen 公司生产的 TOPO TA 克隆试剂盒进行克隆,先将 16S rRNA 基因片段纯化,连接到 pCR2.1-TOPO 载体上,2 μL 连接反应液转化感受态细胞 TOP10,并用 Qiaprep spin Miniprep 试剂盒筛选 TOP10 上的重组质粒。16S rRNA 基因序列由 Sangon Biotech 测定。

1.6 系统发育树的构建

用 Vector NTI Advanced v9.0(InforMax, Inc)软件排序,运用 NCBI 的 BLAST 程序比对数据库中嗜盐菌属的 16S rRNA 基因序列和本研究中得到的 16S rRNA 基因序列。选择相似性高的序列用于系统发育分析。系统发育树用 AlignX(InforMax, Inc)软件和 Tree View v1.5 软件包^[10]构建。

2 结果

2.1 菌株的分离及形态学特征

菌株 YJ0238 为短杆状,宽 0.6 μm~0.8 μm,长 0.9 μm~1.5 μm,有较长鞭毛,菌体形态如图 1 所示。菌落为乳白色,表面光滑湿润,较粘稠,两面颜色一致,边缘规则,革兰氏染色为阴性。

2.2 菌株生理生化特性

菌株 YJ0238 为好氧菌,能在 5%~25% 的 NaCl 浓度范围内生长,在较低的 NaCl 浓度以及不含有 NaCl 的培养基中不能生长;10 d 内的生长上限温度为 55℃,不能在 4℃ 和 13℃ 生长;不具有淀粉酶、脂肪酶和蛋白酶活性;尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶阳性;对卡那霉素、链霉素和庆大霉素有不同程度的耐性,对氨苄青霉素和四环素敏感,吡咯试验阳性,柠檬酸盐和甲基红试验阴性,不能利用葡萄糖和乳糖。将其生理生化特性同 *Idiomarina* 属中成员 *zobellii* 进行比较,如表 1 所示。

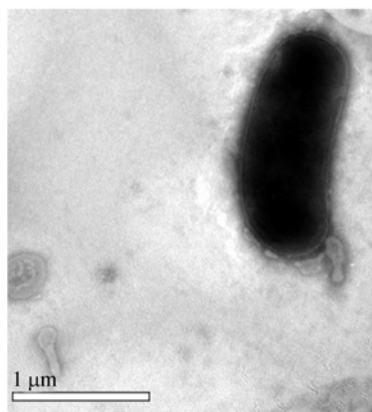


图1 菌株 YJ0238 的电子显微镜照片(×30000)

Fig. 1 Electronic micrograph of strain YJ0238(×30000)

表1 菌株 YJ0238 与 *Idiomarina* 属典型种 *zobellii* 的比较
Table 1 Comparisons of phenotypic features of YJ0238 and *Idiomarina zobellii*

生理生化特性 Physiological and biochemical characteristic	YJ0238	<i>Idiomarina zobellii</i>
细胞直径 Cell diameter	0.6 μm~0.8 μm	0.7 μm~0.9 μm
细胞器 Organelles	鞭毛	鞭毛
代谢 Metabolism	好氧	好氧
NaCl 浓度 Concentration of NaCl	5%~25%	1%~10%
温度 Temperature	20℃~55℃	4℃~30℃
氧化酶 Oxidase	+	+
过氧化氢酶 Catalase	+	+
淀粉酶 Amylase	-	-
脂肪酶 Lipase	-	+
氨苄青霉素抗性 Ampicillin resistance	-	+
卡那霉素抗性 Kanamycin resistance	+	+
四环素抗性 Tetracycline resistance	-	+
葡萄糖利用 Utilization of glucose	-	-
乳糖利用 Utilization of lactose	-	-

注: +: 阳性; -: 阴性 Note: +: positive; -: negative

2.3 菌株 YJ0238 的 16S rRNA 基因序列

扩增菌株 YJ0238 的 16S rRNA 基因序列, 得到了长度约 1.5 kb 的扩增片段, 其电泳图如图 2 所示, 其中菌株 *Serratia marcescens* KMR3 为参比菌株。结果表明菌株 YJ0238 的 16S rRNA 基因序列与参比菌株的 16S rRNA 基因序列大小类似。扩增片段经克隆后测序, 测得菌株 YJ0238 的 16S rDNA 为 1503 bp, 其基因库序列号为 EF693953。

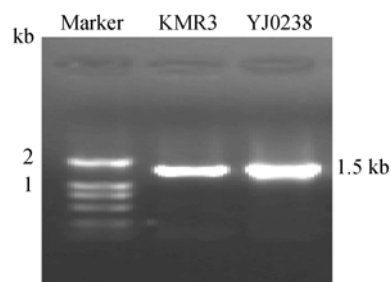


图2 菌株 YJ0238 16S rRNA 基因序列电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of 16S rRNA gene sequences of strain YJ0238

2.4 嗜盐菌系统发育树的构建和 16S rRNA 基因序列的相似性比较

将 YJ0238 的序列输入到 NCBI 基因文库中, 运用 Blast 程序将这株细菌和数据库中嗜盐菌属的 16S rRNA 基因序列进行比对, 从基因文库中挑选 4 株已经发表的^[11-13]、并与 YJ0238 的 16S rRNA 基因序列具有较高相似性的嗜盐菌菌株, 再挑选同样起源于海洋的 *Marinobacter* 属的 4 株嗜盐菌^[14-16]作为外群, 构建系统发育树, 如图 3 所示。

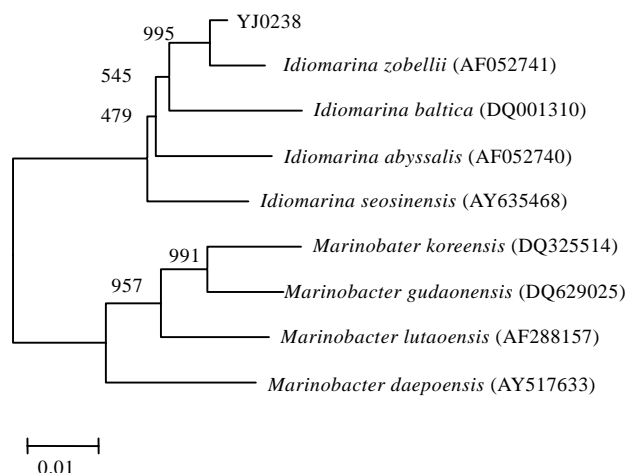


图3 根据 16S rRNA 基因序列构建的嗜盐菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of halophilic bacteria on the basis of 16S rRNA gene sequences

为了比较各菌株间 16S rRNA 基因序列的相似性, 通过 DNASTAR 软件的 Sequence Distances 程序获得各菌株的 16S rRNA 基因序列相似性, 见表 2。

从 16S rRNA 构建的系统发育树以及序列相似性来看, 菌株 YJ0238 与 *Idiomarina zobellii*、*Idiomarina baltica*、*Idiomarina abyssalis* 和 *Idiomarina seosinensis* 分在同一个簇中, 序列同源性分别为 98.8%、96.4%、97.0% 和 96.2%。

表 2 嗜盐菌菌株 16S rRNA 基因序列相似性
Table 2 Similarity of 16S rRNA gene sequences of halophilic bacteria strains

No. and abbreviation	Similarity of 16S rRNA gene sequences (%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 YJ0238		98	96	97	96	85	85	85	84
2 <i>Idiomarina zobelli</i>			95	96	95	84	84	84	84
3 <i>Idiomarina baltica</i>				95	94	83	83	84	82
4 <i>Idiomarina abyssalis</i>					95	84	85	84	84
5 <i>Idiomarina seosinensis</i>						85	85	84	85
6 <i>Marinobacter koreensis</i>							97	95	94
7 <i>Marinobacter gudaonensis</i>								96	93
8 <i>Marinobacter lutaoensis</i>									93
9 <i>Marinobacter daepoensis</i>									

3 讨论

16S rRNA 基因是生物细胞共有的功能同源, 既含有保守序列又含有可变序列的核酸序列, 其序列变化速度与进化速率相适应, 常用于生物物种的分子进化分析, 人们称之为进化计时器^[18]。根据嗜盐菌分类标准^[2], 新的分类单位应当同核苷酸序列的系统发育学进化距离和表型特征及化学分类数据有非常好的相关性。一般认为, 16S rRNA 基因序列同源性低于 98%, 可以认为属于不同种, 同源性小于 93%~95%, 可以认为属于不同属^[19]。

本文所研究的菌株 YJ0238 与 *Idiomarina zobellii* 的亲缘关系最近, 相似率达到了 98.8%。但生活环境及耐盐程度有所不同。*Idiomarina zobellii* 是从太平洋西北海域 4000 m~5000 m 水深处分离到的一株耐寒、耐高压的革兰氏阴性杆菌, 能在 4℃ 生长, 所需的 NaCl 浓度为 1%~10%。已经发表的 *Idiomarina* 属不同种的标准菌株^[11,13,20,21]大多数分离自海洋, 个别来自陆地的盐场, 它们的生长上限温度不超过 46℃。而本文所研究的菌株 YJ0238 是从热盐井中分离得到的, 生长上限温度可达到 55℃, 能耐 25% 的 NaCl 浓度。从生长条件上的差异可以推断出, 一方面 *Idiomarina* 属可能最早起源于海洋, 而一些海洋地处两个板块的交界处, 地热、火山活动频繁, 在此环境中生存的微生物可能潜在的适应了高温环境。另一方面从达尔文的物种起源进化学说来分析, 经过几百万年海洋到陆地的演变, 微生物的自身代谢发生了变化, 逐渐适应了目前的环境。就这两个菌株而言, 它们在菌体形态其它生理

生化特性上比较相似(表 1), 仅在脂肪酶活性和药敏试验上有所差异, 这表明两个菌株在系统分类上的亲缘关系非常接近, 这与系统发育分析的结果一致。因此, 本文所研究的菌株 YJ0238 可以初步认定为是 *Idiomarina* 属成员 *zobellii* 种下的一个亚种。

本课题对菌株 YJ0238 的结构特点和理化性质还有待于进一步的深入研究, 若能将其用于发酵生产, 可具有抵抗高盐浓度环境胁迫能力, 可减少发酵工艺, 降低成本, 并在高盐污水处理方面发挥重要的作用, 另外将极端嗜盐菌紫膜特性应用于电子领域, 开发新科技产品, 也将成为可能。因此, 研究生存于高温、高盐极端环境中的微生物可为今后研究新的物种资源以及微生物多样性提供素材和参考。

参 考 文 献

- [1] 沈 萍. 微生物学(第三版). 北京:高等教育出版社, 2003, pp. 297
- [2] OREN A, GRABT WD. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order halobacteriales. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**: 233-238.
- [3] Robert HM, Blanco C. Glycine betaine carnitine and choline enhance salinity tolerance and prevent the accumulation of sodium to a level inhibiting growth of tetragenococcus halophila. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(2): 509-517.
- [4] Tiemen V, Der HB. Glycine Betaine transport in *Lactococcus lactis* is osmotically regulated at the level of expression and translocation activity. *J Bacteriolog*, 2000,

- 182(1): 203–206.
- [5] Jean L, Cayol SD, Bharat KC, *et al.* *Thermohalobacter berrensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, strictly halophilic bacterium from a solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 559–564.
- [6] Nathalie W, Valerie C. Franc: oise Lesongeur, Marie-Anne Cambon-Bonavita and Georges Barbier, *Caloranaerobacter azorensis* gen. nov., sp. nov., an anaerobic thermophilic bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**: 1789–1796.
- [7] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984, pp. 365–369.
- [8] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 2003, pp. 116–120.
- [9] Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, *et al.* Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**: 6955–6959.
- [10] Page RDM. Treeview: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput*, 1996, **12**: 357–358.
- [11] Ivanova EP, Romanenko LA, Chun J, *et al.* *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**(2): 901–907.
- [12] Anand TP, Bhat AW, Shouche YS, *et al.* Antimicrobial activity of marine bacteria associated with sponges from the waters off the coast of South East India. *Microbiol Res*, 2006, **161**(3): 252–262.
- [13] Choi DH, Cho BC. *Idiomarina seosinensis* sp. nov., isolated from hypersaline water of a solar saltern in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**(1): 379–383.
- [14] Kim BY, Weon HY, Yoo SH, *et al.* *Marinobacter koreensis* sp. nov., isolated from sea sand in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, **56**(11): 2653–2656.
- [15] Gu J, Cai H, Yu SL, *et al.* *Marinobacter gudaonensis* sp. nov., isolated from an oil-polluted saline soil in a Chinese oilfield. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2007, **57**(2): 250–254.
- [16] Yoon JH, Yeo SH, Kim IG, *et al.* *Marinobacter flavimaris* sp. nov. and *Marinobacter daepoensis* sp. nov., slightly halophilic organisms isolated from sea water of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, **54**(5): 1799–1803.
- [17] Shieh WY, Jean WD, Lin YT, *et al.* *Marinobacter lutaoensis* sp. nov., a thermotolerant marine bacter isolated from a coastal hot spring in Lutao, Taiwan. *Can J Microbiol*, 2003, **49**(4): 244–252.
- [18] Wen-xin C. Bacteroal phylogeny. *Atca Microbiol Sinica*, 1998, **38**(3): 240–243.
- [19] Devereuxr HSH, Doyle CL. Diversity and origin of Desulfovibro species: phylogenetic definition of a family. *J Bacterial*, 1990, **172**(7): 3609–3619.
- [20] Stuart P, Donachie SH, Todd SG, *et al.* *Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic c-Proteobacterium from the Loihi submarine volcano, Hawaii. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, **53**: 1873–1879.
- [21] Jose M, Martinez CVB, Fernando MC, *et al.* *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. and *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, **54**: 1793–1797.