

# 南极海冰耐盐细菌 NJ82 的分子鉴定及其耐盐性初步研究

侯艳华<sup>1</sup> 王全富<sup>1,2,3\*</sup> 沈继红<sup>3</sup> 缪锦来<sup>3</sup> 李光友<sup>3</sup>

(1. 哈尔滨工业大学(威海) 海洋学院 威海 264209)

(2. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室 连云港 222005)

(3. 国家海洋局第一海洋研究所 海洋生物活性物质重点实验室 青岛 266061)

**摘要:** 从 129 株南极海冰细菌筛选到 1 株耐盐细菌 NJ82, 该菌最适生长盐度是 12%, 能够耐受最高盐度为 18%。对该菌株进行 16S rRNA 基因序列的同源性和系统发育分析, 结果表明: 菌株 NJ82 属于 *Pseudoalteromonas* 属。从总蛋白质、脯氨酸、丙二醛(MDA)含量及膜透性变化等方面对高盐的适应性进行初步探讨。结果表明, 当盐度介于 3.3%~12.0% 时, 随着盐度升高, 菌株的蛋白质和脯氨酸含量呈快速增加趋势, 而 MDA 含量和膜透性变化幅度不大; 随着盐度进一步升高, 蛋白质含量呈下降趋势, 脯氨酸变化幅度不大; 而 MDA 含量升高和膜透性变化都达到极显著水平( $P<0.01$ )。这些重要生理参数的变化将有助于了解海冰细菌在高盐环境下的适应机制。

**关键词:** 耐盐性, 海冰细菌, 南极, 16S rRNA

## Molecular Identification of a Halotolerant Bacterium NJ82 from Antarctic Sea Ice and Preliminary Study on Its Salt Tolerance

HOU Yan-Hua<sup>1</sup> WANG Quan-Fu<sup>1,2,3\*</sup> SHEN Ji-Hong<sup>3</sup> MIAO Jin-Lai<sup>3</sup> LI Guang-You<sup>3</sup>

(1. School of the Ocean, Harbin Institute of Technology, Weihai 264209)

(2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005)

(3. Key Laboratory of Marine Bio-active Substances, First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266061)

**Abstract:** Halotolerant bacterium NJ82 was screened from 129 strains of Antarctic sea ice bacteria. Optimum salinity for the growth of this strain was 12% (W/V), and the highest salinity tolerance was 18% (W/V). The 16S rRNA gene sequences homology and phylogenetic analysis showed that strain NJ82 belonged to the genus *Pseudoalteromonas*. The contents of protein, proline, Malondialdehyde(MDA) and cell membrane permeability growing at different salinity were analyzed. When salinity was in the range of 3.3%–12.0% (W/V), the protein and proline content both greatly rose with the increase of salinity, but the MDA content

基金项目: 江苏省海洋生物技术重点建设实验室开放基金资助项目(No. 2007HS013); 国家“863计划”资助项目(No. 2007AA091905);

山东省自然科学基金(No. Y2007D58); 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室开放课题(No. MBS-2007-01)

\* 通讯作者: Tel: 0631-5687759; E-mail: wangquanfu2000@126.com

收稿日期: 2007-09-17; 接受日期: 2007-11-13

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

and cell membrane permeability varied little. When the salinity was above 12.0 % (*W/V*), protein content decreased, while MDA contents and cell membrane permeability significantly increased with the increase of salinity. These changes of important physiological parameters would offer significant information to understand the adaptation mechanism of sea ice bacterium to high salinity conditions.

**Keywords:** Salt tolerance, Sea ice bacteria, Antarctic, 16S rRNA

在南极, 海冰的形成非常迅速, 海冰细菌从海水被嵌入到海冰盐囊中, 随之经历了生存环境的巨大变化。温度变化是影响海冰细菌生存的首要因素, 在冬季温度可从冰-水界面的 0℃ 降到冰-气界面的 -30℃; 盐度在海冰形成过程中的剧烈变化是影响微生物生存的另一个重要因素<sup>[1]</sup>。结冰时, 由海水结冰过程析出的卤水导致海冰上部盐度可大于 150%, 使海冰细菌在瞬间需要承受三倍以上海水盐度的压力<sup>[2]</sup>。总之, 在海冰形成过程中, 海冰微生物被嵌入到海冰盐囊中, 使其从生存的海水环境变成海冰盐囊环境, 从而经历温度降低、盐度升高的巨大变化, 因此生存于海冰中的微生物不仅是嗜冷的, 还应是嗜盐的。近年来海冰微生物的分子生态学及其适应机制已经成为微生物学研究的热点之一<sup>[3]</sup>。

目前国内外对海冰细菌生境适应机制的研究大多集中在低温适应性方面<sup>[4, 5]</sup>, 而关于海冰细菌盐度适应机制的报道较少。本研究以 1 株高耐盐南极海冰细菌菌株 NJ82 为材料, 进行了 16S rRNA 分子鉴定, 并初步探讨了其在高盐环境下的适应性, 以期了解南极海冰细菌耐盐机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

南极细菌 NJ82, 由国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室从 2001 年第 18 次南极科学考察采集的南极海冰(68°30'E, 65°00'S)中分离获得。

### 1.2 培养基及培养条件

发酵培养基为 2216E 培养基, 配方为: 蛋白胨, 5 g; 酵母粉, 1 g。用过滤海水定容至 1 000 mL, pH 7.0~7.5,  $1 \times 10^5$  Pa 湿热灭菌 20 min。海水取自山东省威海市渤海湾。

盐度梯度培养基: 在 2216E 培养基(海水的盐度按 3.3% (*W/V*)NaCl 计算)基础上加入 NaCl, 使最终盐度为 3.3%、6%、9%、12%、15%和 18%。按 5% 接种量( $OD_{540}=0.650$ )接入 50 mL 不同盐度的 2216E 液体培养基中, 100 r/min 摇床振荡, 10℃ 培养 96 h

后, 15000 r/min 离心 15 min, 收集菌体。菌体用蒸馏水洗 3~4 次, 用于测定总蛋白质、脯氨酸和 MDA 含量等指标。

### 1.3 菌株 NJ82 的生长测定

每隔 1 d 取样, 以培养基作对照, 测定 540 nm 吸光值。

### 1.4 16S rRNA 基因序列测定与系统发育树分析

#### 1.4.1 细菌总 DNA 的提取: 按照 CTAB 方法<sup>[6]</sup>。

1.4.2 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增: 采用细菌 16S rRNA 基因的通用引物, 引物序列为: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 包括:  $1 \times$ PCR 缓冲液, 1.6 mmol/L  $MgCl_2$ ,  $4 \times$ dNTP 混合物各 100  $\mu$ mol/L, 引物各 1.0  $\mu$ mol/L, Taq DNA 聚合酶 1U, 模板 DNA 1  $\mu$ L。PCR 反应条件为: 94℃, 5 min; 94℃, 1 min, 53℃, 1 min, 72℃, 1 min 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.4.3 16S rRNA 基因文库的构建: 以上海华舜 DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行回收纯化, 克隆到 pMD18-T 质粒载体上, 并转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞, 然后进行阳性克隆的筛选; 用北京赛百盛质粒纯化试剂盒提取阳性克隆的质粒并进行酶切鉴定; 酶切成功的质粒送交上海华大基因测序公司完成测序工作。测序引物为通用引物。

1.4.4 16S rRNA 基因序列测定与系统进化关系的分析: 将所测定菌株 NJ82(EF601702) 的 16S rRNA 基因序列(大约 1.5 kb), 同 GenBank 数据库中选取的与菌株亲源关系较近 16S rRNA 基因序列, 用 BioEdit 软件的多序列比对排列(Clustalw multiple alignment)进行序列比对; 用 DNASTar 软件进行序列相似性比较; 系统发育分析采用 Mega2 软件的邻接法(Neighbor-joining method)进行; 通过自举分析(Boot-strap)进行置信度检测, 自举数据集为 1000 次。

### 1.5 耐盐理化性质指标的测定

以 15000 r/min 离心 15 min, 菌体收集后用微孔滤膜(孔径 0.22  $\mu$ m; 直径 45 mm)过滤, 然后用蒸

馏水洗 3~4 次, 15000 r/min 离心 15 min 收集菌体, 用于测定以下理化性质指标。总蛋白质含量的测定采用 Bradford 法测定蛋白质含量 (单位: mg/g 干重)。脯氨酸含量测定采用茚三酮比色法<sup>[7]</sup>; 丙二醛 (MDA) 含量测定采用硫代巴比妥酸法<sup>[8]</sup>; 膜透性测定采用电导法<sup>[9]</sup>。

以上实验均同时做 3 组平行, 所得数据在 SPSS 10.0 软件上进行平均值和标准偏差的计算与显著性差异分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 耐盐菌的筛选

对本实验分离、纯化的 129 株南极海冰细菌进行菌株耐盐性筛选, 其中菌株 NJ82 耐盐性最好, 其最适生长盐度为 12%, 最高耐盐度达到 18% (见图 1)。

### 2.2 菌株 NJ82 的 16S rRNA 分子鉴定

菌株 NJ82 的革兰氏染色反应为阴性, 菌体呈杆状, 长为 2.7  $\mu\text{m}$ ~3.3  $\mu\text{m}$ , 宽为 0.9  $\mu\text{m}$ ~1.2  $\mu\text{m}$ , 端生单根鞭毛, 能运动。在 2216E 平板上均为透明色

湿润、突起的小菌落, 不产色素。对菌株 NJ82 的 16S rRNA 基因序列的相似性进行比较, 结果表明: 菌株 NJ82 的序列与 *Pseudoalteromonas elyakovii* 序列最高相似性达到 99.8%。从图 2 系统进化树可见, 菌株 NJ82 属于交单胞菌目 (Alteromonadales), 交替单胞菌科 (Alteromonadaceae), 假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*)。

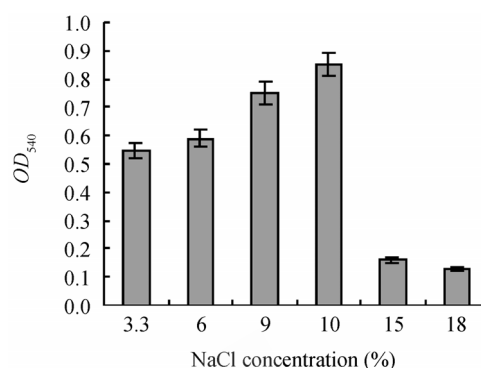


图 1 不同盐度下海冰细菌 NJ82 的生长情况

Fig. 1 Growth of sea ice bacterium NJ82 under different salinity

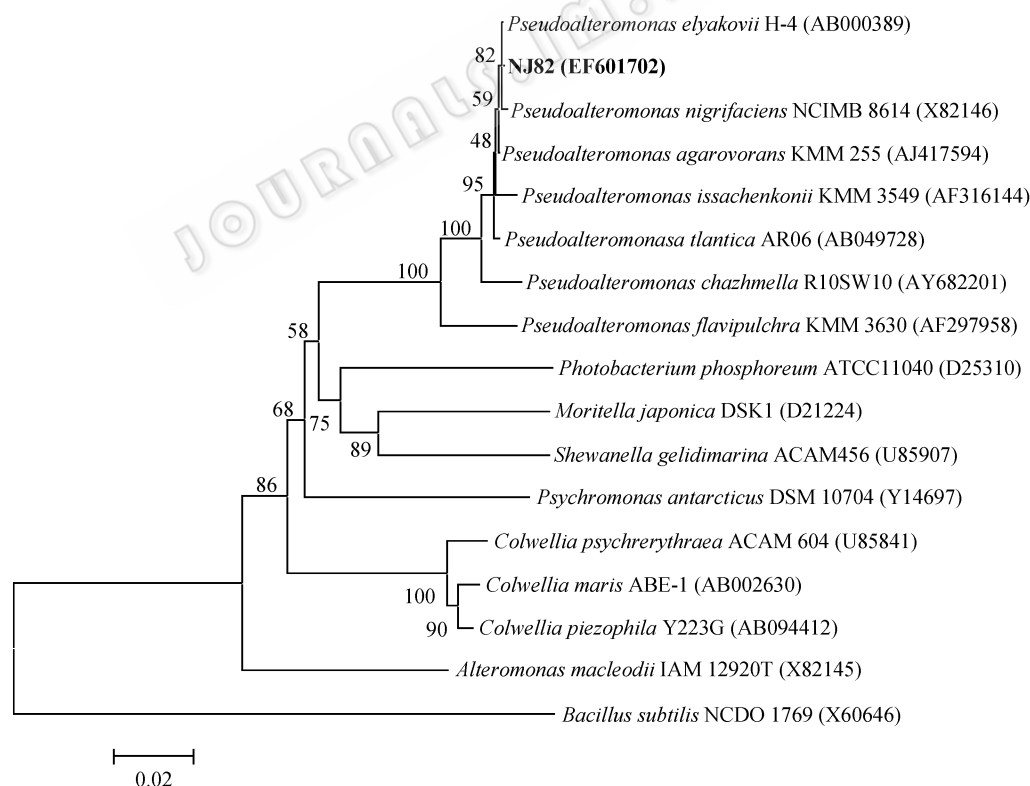


图 2 菌株 NJ82 和相关菌株序列的 16S rRNA 基因序列的邻接法系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the relationships of strain NJ82 with the related species constructed by the neighbour-joining method and based on 16S rRNA gene sequences

注: 结点处数字为 bootstrap 值, 括号内为序列登录号 Note: Bootstrap values are shown at the branch points

### 2.3 不同盐度下菌株 NJ82 的细胞总蛋白质和脯氨酸含量变化

不同盐度下海冰细菌 NJ82 的细胞总蛋白质含量见图 3。可以看出, 当盐度介于 3.3%~12.0% 时, 随着盐度升高, 菌株蛋白质的含量快速增加, 在盐度为 12% 达到蛋白质最大值 38.5%。随着盐度进一步升高, 蛋白质含量呈下降趋势。不同游离脯氨酸含量变化结果见图 4。可以看出, 在整个盐度范围内, 脯氨酸的含量变化幅度不大, 其最大值 26.8 U/g DW 出现在盐度为 15%, 随后略呈下降趋势。脯氨酸 (Proline) 是一种重要的有机渗透调节物质, 具有平衡液泡中的高浓度盐分, 避免细胞质脱水, 稳定细胞蛋白质结构, 防止酶变性失活和保持氮含量等的作用<sup>[10]</sup>, 脯氨酸的积累是海冰细菌为了适应高盐环境而采取的一种保护性措施。

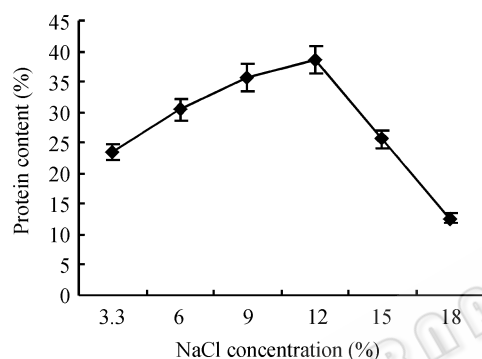


图 3 不同盐度下海冰细菌 NJ82 蛋白质的含量  
Fig. 3 Protein content of sea ice bacterium NJ82 under different salinity

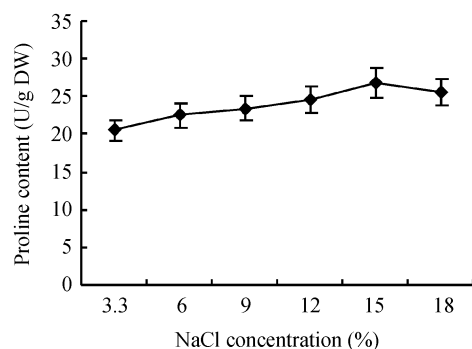


图 4 不同盐度下海冰细菌 NJ82 的脯氨酸含量  
Fig. 4 Proline content of sea ice bacterium NJ82 under different salinity

### 2.4 不同盐度下海冰细菌 NJ82 的丙二醛含量和脂膜透性的变化

丙二醛是硫代巴比妥酸的主要代谢产物, 反映

了有毒活性氧的变化, 是脂质过氧化的重要标志<sup>[8]</sup>。不同盐度下海冰细菌 NJ82 的 MDA 含量见图 5。可以看出, 当盐度介于 3.3%~12.0% 时, 海冰细菌 NJ82 的丙二醛含量变化幅度不大, 介于 0.42 nmol/g ~ 0.58 nmol/g; 而随着盐度增加, MDA 含量极显著上升达到 1.23 nmol/g ( $P < 0.01$ )。不同盐度下海冰细菌 NJ82 的膜透性变化见图 6。可以看出, 细胞膜透性变化与丙二醛的变化相似的, 当盐度介于 3.3%~12.0% 时, 海冰细菌 NJ82 的膜透性变化幅度小; 当盐度升高从 12% 升高到 18%, 膜透性变化幅度最大。以上结果表明, 当盐度介于 3.3%~12.0% 时, 细胞脂膜的 MDA 含量和膜透性变化小, 质膜在高盐环境中维持其正常生理活动的的能力; 而当盐度进一步升高时, 细胞 MDA 含量快速增加, 菌株 NJ82 在高盐环境下产生一定量的活性氧, 活性氧产生了毒性作用, 在一定程度上破坏脂质的功能, 从质膜透性变化的幅度上也进一步证实了上述结论, 因此海冰细菌 NJ82 的质膜透性增加是盐伤害的本质之一。

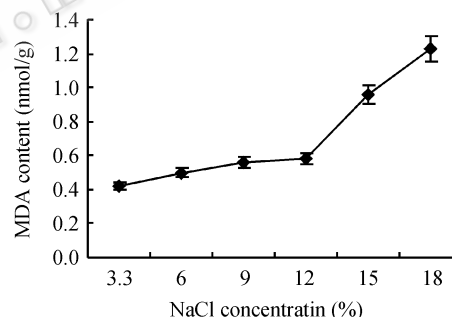


图 5 不同盐度下海冰细菌 NJ82MDA 的含量  
Fig. 5 MDA content of sea ice bacterium NJ82 under different salinity

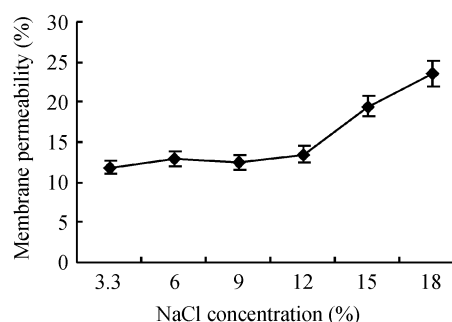


图 6 不同盐度下海冰细菌 NJ82 的质膜透性变化  
Fig. 6 Change of cell membrane permeability of sea ice bacterium NJ82 under different salinity

### 3 结论

从 129 株南极海冰细菌中筛选得到 *Pseudoalteromonas* sp. NJ82, 其最适生长盐度为 12%, 最高耐受盐度为 18%。对该菌株在高盐环境下的适应性进行初步探讨, 结果表明, 当盐度 3.3%~12.0% 时, 随着盐度增加, 菌株的蛋白质和脯氨酸含量呈快速增加趋势, 而丙二醛含量和膜透性变化幅度不大; 随着盐度进一步升高, 蛋白质含量呈下降趋势, 脯氨酸变化幅度不大; 丙二醛含量升高和膜透性变化都达到极显著水平( $P<0.01$ )。这一研究可为南极海冰细菌的高盐环境分子适应机理研究和深入开发海冰微生物资源提供科学依据。

### 参考文献

- [1] Mock T, Thomas DN. Recent advances in sea-ice microbiology. *Environ Microbiol*, 2005, 7(5): 605–619.
- [2] Thomas DN, Dieckmann GS. Antarctic sea ice—a habit for extremophiles. *Science*, 2002, 295(25): 641–644.
- [3] Raymond JA, Fritsen C, Shen K. An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 61(2): 214–221.
- [4] Wang QF, Miao JL, Hou YH, *et al.* Expression of CspA and GST by an Antarctic psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 at near-freezing temperature. *World J Microbiol Biotechnol*, 2006, 22(4): 311–316.
- [5] Chattopadhyay MK. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *J Biosci*, 2006, 31(1): 157–165.
- [6] Wilson K. Current protocols in molecular biology. New York: Wiley & Sons, 1987, pp.2.10–2.12.
- [7] 赵可夫. 植物抗盐生理. 北京: 中国科学技术出版社, 1993, pp.9–10.
- [8] 王爱国, 邵从本, 罗广华. 丙二醛作为植物脂质过氧化指标探讨. 植物生理学通讯, 1986, 22(2): 55–57.
- [9] 李明亮, 赵可夫. NaCl 对甜土植物和盐生植物生理效应的研究. 曲阜师范大学学报, 1990, 16(2): 64–69.
- [10] Claussen W. Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Sci*, 2005, 168(1): 241–248.

### 稿件书写规范

#### 论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前三个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*HI、*Hind*III、*Eco*RI、*Msp*I、*Sau*3AI 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。