



## 研究报告

## 河南叶县岩盐可培养中度嗜盐菌的多样性

张科<sup>1,2</sup> 李臻<sup>3</sup> 郑瑶<sup>1,2</sup> 麻红星<sup>1,2</sup> 刘梦含<sup>1,2</sup> 丁慧杰<sup>1,2</sup> 王瑜<sup>1,2</sup> 刘丽<sup>1,2</sup> 夏西超<sup>\*1,2</sup>

1 平顶山学院医学院 河南 平顶山 467000

2 平顶山市药用微生物工程中心 河南 平顶山 467000

3 郑州大学人民医院 河南省人民医院微生物组实验室 河南 郑州 450003

**摘要:**【背景】嗜盐微生物因为独特的生理和代谢特征而对高盐环境有着良好的适应能力,在环境污染治理、酶制剂等领域具有很高的应用和研究价值,是一类重要的极端环境微生物资源。【目的】为了更好地认识我国岩盐微生物的多样性,开发和利用嗜盐微生物资源,积累丰富的微生物菌种资源。【方法】在5%和10%的盐度下,使用 Alkaline oligotrophic medium (AOM)、Neutral haloarchaeal medium (NHM)、Diluted modified marine agar (dmMA)和 ISP3 medium (ISP3)四种培养基,分离和纯化河南叶县岩盐矿的卤水和盐土中的嗜盐菌,使用细菌通用引物 27F 和 1492R 扩增和测序纯化菌株的 16S rRNA 基因,使用 EzBioCloud 和 NCBI 上的 BLAST 比对进行分子鉴定,使用 MEGA 5.0 进行遗传进化分析。【结果】从河南叶县岩盐卤水和盐土中一共分离和纯化到 78 株细菌,菌株 16S rRNA 基因序列显示它们来自 3 个门:厚壁菌门(*Firmicutes*)的 *Bacillus* 26 株、*Halobacillus* 30 株、*Oceanobacillus* 10 株和 *Staphylococcus* 1 株;变形菌门(*Proteobacteria*)的 *Sphingomonas* 3 株和 *Halomonas* 5 株;放线菌门(*Actinobacteria*)的 *Brevibacterium* 3 株。*Halobacillus* 和 *Bacillus* 的细菌在叶县岩盐可培养中度嗜盐菌中具有较高的丰度。AOM 培养基分离出了最多 5 个属的细菌,并且仅从 AOM 培养基分离出了 *Sphingomonas* 和 *Brevibacterium* 的细菌;另外,仅从 ISP3 分离出了 *Oceanobacillus* 的细菌;4 种培养基都培养出了 *Halobacillus* 和 *Bacillus* 的细菌。来自卤水的有 *Bacillus*、*Halobacillus*、*Oceanobacillus*、*Sphingomonas* 和 *Staphylococcus*;来自盐土有 *Bacillus*、*Brevibacterium*、*Halomonas*。另外,5% 和 10% 两个盐度下都纯化出 *Bacillus*、*Brevibacterium*、*Halobacillus* 和 *Sphingomonas*;仅在 10% 的盐度下纯化到 *Halomonas* 和 *Oceanobacillus* 的细菌;仅在 5% 的盐度下培养出一株 *Staphylococcus*。【结论】揭示了河南叶县岩盐可培养中度嗜盐菌的多样性,发现 *Halobacillus* 和 *Bacillus* 在可分离培养的中度嗜盐菌中具有较高的丰度,为深入开展岩盐嗜盐微生物研究积累了较为丰富的微生物菌株资源。

关键词: 叶县, 岩盐, 中度嗜盐菌, 多样性

**Foundation items:** Key Scientific Research Projects of Colleges and Universities in Henan Province (16B180004); Training Program of National Natural Science and Foundation of Pingdingshan University (PXY-PYJJ2016004); Scientific Research Start-up Foundation for the High-level Talent of Pingdingshan University (PXY-BSQD-2015006)

\*Corresponding author: E-mail: xiachao8336@163.com

Received: 15-05-2020; Accepted: 21-09-2020; Published online: 25-09-2020

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(16B180004); 平顶山学院国家自然科学基金培育项目(PXY-PYJJ2016004); 平顶山学院高层次人才科研启动项目(PXY-BSQD-2015006)

\*通信作者: E-mail: xiachao8336@163.com

收稿日期: 2020-05-15; 接受日期: 2020-09-21; 网络首发日期: 2020-09-25

## Biodiversity of culturable moderate halophilic bacteria of rock salt in Yexian county, Henan province

ZHANG Ke<sup>1,2</sup> LI Zhen<sup>3</sup> ZHENG Yao<sup>1,2</sup> MA Hong-Xing<sup>1,2</sup> LIU Meng-Han<sup>1,2</sup>  
DING Hui-Jie<sup>1,2</sup> WANG Yu<sup>1,2</sup> LIU Li<sup>1,2</sup> XIA Xi-Chao<sup>\*1,2</sup>

1 College of Medicine, Pingdingshan University, Pingdingshan, Henan 467000, China

2 Medical Microbiology Engineering Center in Pingdingshan, Pingdingshan, Henan 467000, China

3 Microbiome Laboratory, Henan Provincial People's Hospital, People's Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450003, China

**Abstract:** [Background] Halophilic microorganisms with unique physiological and metabolic characteristics for living in hypersaline environment have high application and research value in the fields of environmental pollution control, enzyme preparation and are one type of important microbial resources from extreme environment. [Objective] To uncover species diversity of cultivable moderate halophilic microorganisms in rock salt in China, to develop and utilize halophilic microbial resources and to accumulate strains of halophilic microorganisms, this research was conducted. [Methods] Moderate halophilic bacteria were isolated from brine and salt soil by using alkaline oligotrophic medium (AOM), neutral haloarchaeal medium (NHM), diluted modified marine agar (dmMA) and ISP3 medium (ISP3) under 5% and 10% salinity separately. Bacteria 16S rRNA gene amplification and sequencing were carried out by using bacterial common primers 27F and 1492R. EzBioCloud and BLAST in NCBI web were used for the bacterial taxonomy and phylogenetic tree was constructed by MEGA 5.0. [Results] In all, 78 strains were isolated from brine and salt soil in rock salt in Yexian county, Henan province. The results of 16S rRNA gene sequences indicated that they ranged three phylum in seven genus including: 26 strains in genus of *Bacillus*, 30 strains in *Halobacillus*, 10 strains in *Oceanobacillus* and one strain of *Staphylococcus* in phylum *Firmicutes*; 3 strains in *Sphingomonas* and 5 strains in *Halomonas* in the phylum *Proteobacteria*; 3 strains in *Brevibacterium* in the phylum *Actinobacteria*. The genus of *Halobacillus* and *Bacillus* had higher abundance in the rock salt from Yexian county, Henan province. At the most, five genus bacteria were isolated by using AOM medium and only by using AOM, *Sphingomonas* and *Brevibacterium* were isolated. In addition, *Oceanobacillus* were isolated from brine by using ISP3. By using the four media, *Halobacillus* and *Bacillus* were isolated. *Bacillus*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus*, *Sphingomonas* and *Staphylococcus* were from brine, and *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Halomonas* were from salt soil. Third, under the 5% and 10% salinity, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Halobacillus* and *Sphingomonas* were isolated and only under 10% salinity, *Halomonas* and *Oceanobacillus* were isolated, only one strain *Staphylococcus* was isolated under 5% salinity. [Conclusion] The community structure and diversity of rock salt in Yexian county, Henan province were uncovered and *Halobacillus* and *Bacillus* had higher abundance in the culturable Moderate Halophilic Bacteria genus. This research has provided rich Moderate Halophilic Bacteria resources for developing rock salt bacteria.

**Keywords:** Yexian county, Rock salt, Moderate halophilic bacteria, Biodiversity

嗜盐微生物(halophiles)是一类生长于盐湖、盐碱土壤、晒盐场、盐矿以及高盐制品等富盐极端环境下的特殊微生物,它们通过在胞内积累高浓度的盐离子或者有机相容性溶质来适应富盐的极端环境,同时产生水解酶、多聚物、表面活性物质、光敏蛋白、色素和细胞毒素等多种生物活性

物质,在可降解材料、生物燃料、酶制剂、制药领域等新型生物化工产业以及污染治理和污水处理等领域具有较强的应用价值和研究价值<sup>[1]</sup>。因此,嗜盐微生物逐渐成为科学家关注的焦点。在我国,科学家围绕新疆<sup>[2-3]</sup>、青海<sup>[4]</sup>、西藏<sup>[5]</sup>、内蒙<sup>[6]</sup>、陕西<sup>[7]</sup>、山西<sup>[8]</sup>等地的盐湖、盐碱土壤等富

盐环境, 以及沿海的海水、盐田<sup>[9-10]</sup>开展了大量的嗜盐微生物相关研究。这些研究表明嗜盐微生物广泛存在于各种富盐环境。

岩盐是陆地闭塞凹陷环境在强烈的干旱或蒸发作用下、海水或者湖水干涸、盐类物质逐渐沉积又在地质挤压等作用下逐渐形成的盐类岩石, 是一种富盐环境<sup>[11]</sup>。然而目前国内外关于岩盐微生物的研究较少。2006年, 田新朋等<sup>[12]</sup>从云南盐矿分离到 *Halorubrum*、*Natronococcus*、*Natrialba* 和 *Halalkalicoccus* 等4个属的嗜盐微生物。2006年, 肖炜等<sup>[13]</sup>从昆明盐矿古老岩盐沉积物分离到厚壁菌门、变形菌门和放线菌门3个门44株细菌, 其中7株可能是新种或者新属。2007年, 陈义光等<sup>[14]</sup>从一平浪盐矿古老岩盐沉积物分离到4个门24个属的微生物, 其中Y21菌株可能是 *Staphylococcaceae* 的一个新属。2011年, Gramain 等在智利 Salar Grande 盐矿的盐芯中发现 *Halobacterium* 的微生物<sup>[15]</sup>。2013年, Xiao 等<sup>[16]</sup>分析了云南盐矿的细菌和古菌物种多样性, 发现不同地点盐矿样品物种多样性存在较大差异。2015年, Chen 等<sup>[17]</sup>在云南盐矿发现了一个新物种 *Halorubrum yunnanense*。2019年, 陈礼楠等<sup>[18]</sup>从安徽定远盐矿盐芯样品中分离到嗜盐古菌150株、嗜盐细菌114株, 发现产胞外蛋白酶菌株1株、酯酶1株、产淀粉酶2株、能液化明胶菌株2株。这些研究表明盐矿同样蕴含着丰富的嗜盐微生物, 是研究嗜盐微生物的良好材料。

河南省西南部的平顶山市叶县, 地处扬子至华北古板块碰撞诱发的舞阳凹陷盆地, 独特的地质构造活动促使了盐岩沉积物的形成<sup>[19-20]</sup>。在叶县境内展布面积达400 km<sup>2</sup>, 远景资源储量3300亿t的岩盐, 氯化钠平均含量为85%–95%, 品位居全国井盐之首, 为全国第二大内陆盐田, 被誉为“中国岩盐之都”<sup>[21]</sup>。然而, 该地岩盐嗜盐微生物相关的研究未见报道。本研究采用前言(1 材料与与方法前) Alkaline oligotrophic medium (AOM)、Neutral

haloarchaeal medium (NHM)、Diluted modified marine agar (dmMA)和ISP3 medium (ISP3)这4种培养基, 在5%和10%两种盐度下分离和纯化卤水和盐土中的嗜盐微生物, 探讨叶县岩盐可培养中度嗜盐微生物的多样性, 以期为开发和利用叶县岩盐微生物资源以及了解岩盐形成的生物因素提供参考。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试样品

2018年9月–2019年6月, 在河南省平顶山市叶县(33°62'N, 113°35'E)采集卤水和盐土样本。用5个干净的10 L水桶装50 L卤水, 在多个采样点用50 mL的离心管采集10管盐土带回平顶山学院药用微生物工程中心, 立即处理。

#### 1.1.2 培养基

AOM 和 NHM 是常见的用于嗜盐微生物分离和培养的培养基<sup>[22-23]</sup>; ISP 系列培养基主要用于放线菌以及嗜盐放线菌的分离和培养, ISP3 是其中的常用培养基<sup>[24]</sup>; 另外, dmMA 是寡营养培养基, 有报道<sup>[25]</sup>使用寡营养培养基获得了3个潜在的新属和13个潜在的新种。因此选择了以上4种培养基, 分别以10%和5%两个盐度来分离和纯化中度嗜盐细菌。(1) AOM 培养基(g/L)<sup>[22-23]</sup>: 酵母提取物 0.05, 鱼粉蛋白胨 0.25, 丙酮酸钠 1.0, 氯化钾 5.4, 氯化钙 0.1, 硝酸钠 0.5, 七水硫酸镁 0.1, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液 2 mL, pH 9.0。使用 0.1 mol/L 的 HCl 调节 pH 至 7.0。(2) NHM 培养基(g/L)<sup>[22-23]</sup>: 酵母提取物 0.05, 鱼粉蛋白胨 0.25, 丙酮酸钠 1.0, 氯化钾 5.4, 氯化钙 0.29, 氯化铵 0.27, 七水硫酸镁 26.8, 六水氯化镁 23.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 缓冲液 2 mL, pH 7.0。(3) ISP3 培养基(1 L)<sup>[24]</sup>: 燕麦 20 g 煮沸取滤液, 硫酸亚铁 1 mg, 硫酸锌 1 mg, 氯化锰 1 mg, 维生素 B<sub>1</sub> 0.5 mg, 维生素 B<sub>2</sub> 0.5 mg, 维生素 B<sub>6</sub> 0.05 mg, 维生素 E 1 mg, 维生素 C 5 mg。(4) dmMA 培养基(g/L)<sup>[25]</sup>: 胰蛋白胨 0.5, 酵母提取粉 0.1, 硫酸镁 20.0, 硫酸钠 20.0。

以上为液体培养基, 加入 20 g/L 的琼脂即为对应的固体培养基;  $K_2HPO_4$  缓冲液: 取 0.5 mol/L  $KH_2PO_4$  30 mL, 加 0.5 mol/L  $K_2HPO_4$  100 mL, 混匀, 用约 2 mL 0.5 mol/L  $K_2HPO_4$  调节 pH 到 7.5。由于采集的卤水是饱和的盐水, 含盐约 30%, 因此分别使用稀释 6 倍(含盐约 5%)、3 倍(含盐约 10%) 的卤水配制以上固体培养基和液体培养基。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

2×Taq PCR Mix, 天根生化科技(北京)有限公司。生化培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 水平电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

### 1.2 样品预处理

对于卤水, 带回实验室的卤水立即使用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤富集卤水中的微生物。使用无菌剪刀把富集过的滤膜绞碎, 置于 50 mL 液体培养基中, 28 °C、120 r/min 富集培养 48–96 h。盐土预处理: 称取 10 g 土壤, 加入 100 mL 过滤后的高压灭菌过的卤水, 混匀, 取上清, 即菌悬液。取 2 mL 菌悬液加入到 50 mL 液体培养基中, 28 °C、120 r/min 富集培养 48–96 h 甚至更长时间, 直至培养基浑浊。

### 1.3 菌株分离和保菌

把富集培养的菌液进行  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  梯度稀释, 分别取 200  $\mu$ L 稀释菌液涂布到对应的固体培养基, 28 °C 培养 48–96 h, 直到肉眼可见菌落。尽量挑取形态具有差异的菌落, 如果形态类似就随机挑取多个菌落, 在对应的固体培养基上做划线培养, 直到获得单菌落, 再做液体培养。以含 30% 甘油的对应液体培养基作为保菌液, 取 400  $\mu$ L 菌液, 等比例加入保菌液,  $-80$  °C 环境下保存。

### 1.4 细菌 16S rRNA 基因扩增与测序

采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTT GTTACGACTT-3')对分离纯化的菌株进行鉴定。以稀释的菌液作为模板: 用 1 mL 液体培养基进行梯

度稀释, 经灭菌的生理盐水作为稀释液, 得到  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  共 3 种浓度的稀释菌液。PCR 反应体系 (30  $\mu$ L): 2×Taq PCR Mix 为 15  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 为 12.6  $\mu$ L, 引物 27F (20  $\mu$ mol/L) 0.2  $\mu$ L, 引物 1492R (20  $\mu$ mol/L) 0.2  $\mu$ L, 模板 2  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 50 s, 53 °C 45 s, 72 °C 120 s, 34 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 得到 1 500 bp 左右的条带, 切下目的条带, 送通用生物系统(安徽)有限公司和北京六合华大基因科技有限公司测序, 选择两头测序、测通的测序方式。

### 1.5 细菌 16S rRNA 基因分析与初步鉴定

对于测序返回的 16S rRNA 基因序列, 导入原核生物在线分析软件 EzBioCloud<sup>[26]</sup> (<https://www.ezbiocloud.net/>)初步判断分类地位。运用 NCBI 网站在线 BLAST 功能, 比对获得其参考序列。两个数据库比对结果相悖的时候, 在 NCBI 比对过程中参考序列注释到多个种的, 以 EzBioCloud 比对结果为准。最后使用 MEGA 5.0<sup>[27]</sup>, 采用邻接 (neighbor-joining, NJ)法<sup>[28]</sup>聚类分析和构建系统发育进化树。重复取样(bootstrap value) 1 000 次, 评估系统进化树的拓扑结构稳定性<sup>[29]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 河南叶县岩盐中度嗜盐菌的分离结果

经过纯化培养和初步鉴定, 一共获得了嗜盐菌株 78 株, 分布在 3 个门 7 个属: 变形菌门 (*Proteobacteria*) 的 *Sphingomonas* 3 株、*Halomonas* 5 株; 放线菌门 (*Actinobacteria*) 的 *Brevibacterium* 属 3 株; 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 的 *Bacillus* 26 株、*Halobacillus* 30 株、*Oceanobacillus* 10 株和 *Staphylococcus* 1 株, 详见表 1。

### 2.2 4 种培养基的比较

ISP3 培养基分离出来了最多的菌株, 并且仅有该培养基分离到 *Oceanobacillus* 的细菌; 仅有 AOM 培养基分离出来了 *Sphingomonas* 和 *Brevibacterium* 的细菌, 并且与其他培养基相比,

表 1 4 种培养基分离菌株的种属分布

Table 1 Culturable bacteria distribution in phylum and genus from 4 media

Phylum	Genus	Strains number				Total
		NHM	AOM	ISP3	dmMA	
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	8	4	11	3	26
	<i>Staphylococcus</i>	1	0	0	0	1
	<i>Oceanobacillus</i>	0	0	10	0	10
	<i>Halobacillus</i>	3	4	6	5	18
Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i>	0	3	0	0	3
Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	0	3	0	0	3
	<i>Halomonas</i>	6	5	3	3	17
Total	7	18	19	30	11	78

该培养基培养出来了最多 5 个属的细菌; dmMA 培养基仅培养出来 *Halomonas*、*Halobacillus* 和 *Bacillus* 3 个属的细菌, 而其他 3 种培养基也培养出来了这 2 个属的细菌, 也就是说, 在属水平上, dmMA 培养基没有分离出来具有特色的菌属; 另外, 这 4 种培养基都培养出了不同数量的 *Halobacillus* 和 *Bacillus*。

### 2.3 2 个盐度的比较

相同的是, 盐度 5% 和 10% 纯化到的菌株数量一致, 均为 39 株, 并且在 2 个盐度下都纯化出 *Bacillus*、*Brevibacterium*、*Halobacillus* 和 *Sphingomonas* 的细菌, 也就是说这 4 类菌属适应的

盐度位于 5%–10% 附近, 它们有着比较宽的盐度适应性。不同的是: 仅从 10% 的盐度纯化到 *Halomonas* 和 *Oceanobacillus* 的细菌, 即这两类菌属适应的盐度处于 10% 附近甚至更高; 在 5% 的盐度下没有培养出来 *Halomonas* 和 *Oceanobacillus*, 培养出来 1 株 *Staphylococcus*, 即该菌属适应的盐度处于 5% 附近甚至更低。

### 2.4 2 个样品的比较

盐土和卤水中都分离到了 *Bacillus* 和 *Halobacillus*, 只是从盐土中分离到了更多的 *Halobacillus*, 从分离和纯化的结果来看, 他们在卤水和盐土中具有较高丰度; 仅在卤水中分离到了 *Oceanobacillus*、*Sphingomonas* 和 *Staphylococcus*; 仅在盐土里面分离到了 *Brevibacterium* 和 *Halomonas*, 详见表 2。

### 2.5 同源比对和遗传进化分析

菌株的 16S rRNA 基因序列登录号已经上传 GenBank, 登录号见表 3。把测序菌株的 16S rRNA 基因序列导入 EzBioCloud 在线分析软件进行初步判断; 再在 NCBI 做 BLAST 比对, 把相似度最高的序列一条作为参考序列(表 3), 相似度在 99%–100%。然后使用 MEGA 5.0 软件(NJ 法)构建系统发育树, 见图 1。

表 2 卤水和盐土分离中度嗜盐菌的种属分布

Table 2 Culturable bacteria distribution in phylum and genus from brine and saline soil

Phylum	Genus	Strains number				Total
		5% Brine	10% Brine	5% Saline soil	10% Saline soil	
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	13	2	9	2	26
	<i>Oceanobacillus</i>	0	10	0	0	10
	<i>Staphylococcus</i>	1	0	0	0	1
	<i>Halobacillus</i>	0	4	0	14	18
Actinobacteria	<i>Sphingomonas</i>	2	1	0	0	3
Proteobacteria	<i>Halomonas</i>	0	0	13	4	17
	<i>Brevibacterium</i>	0	0	1	2	3
Total		16	17	23	22	78

表 3 河南叶县岩盐可培养中度嗜盐菌的分离与鉴定

Table 3 Identification of bacteria isolated from Yexian county rock salt in Henan

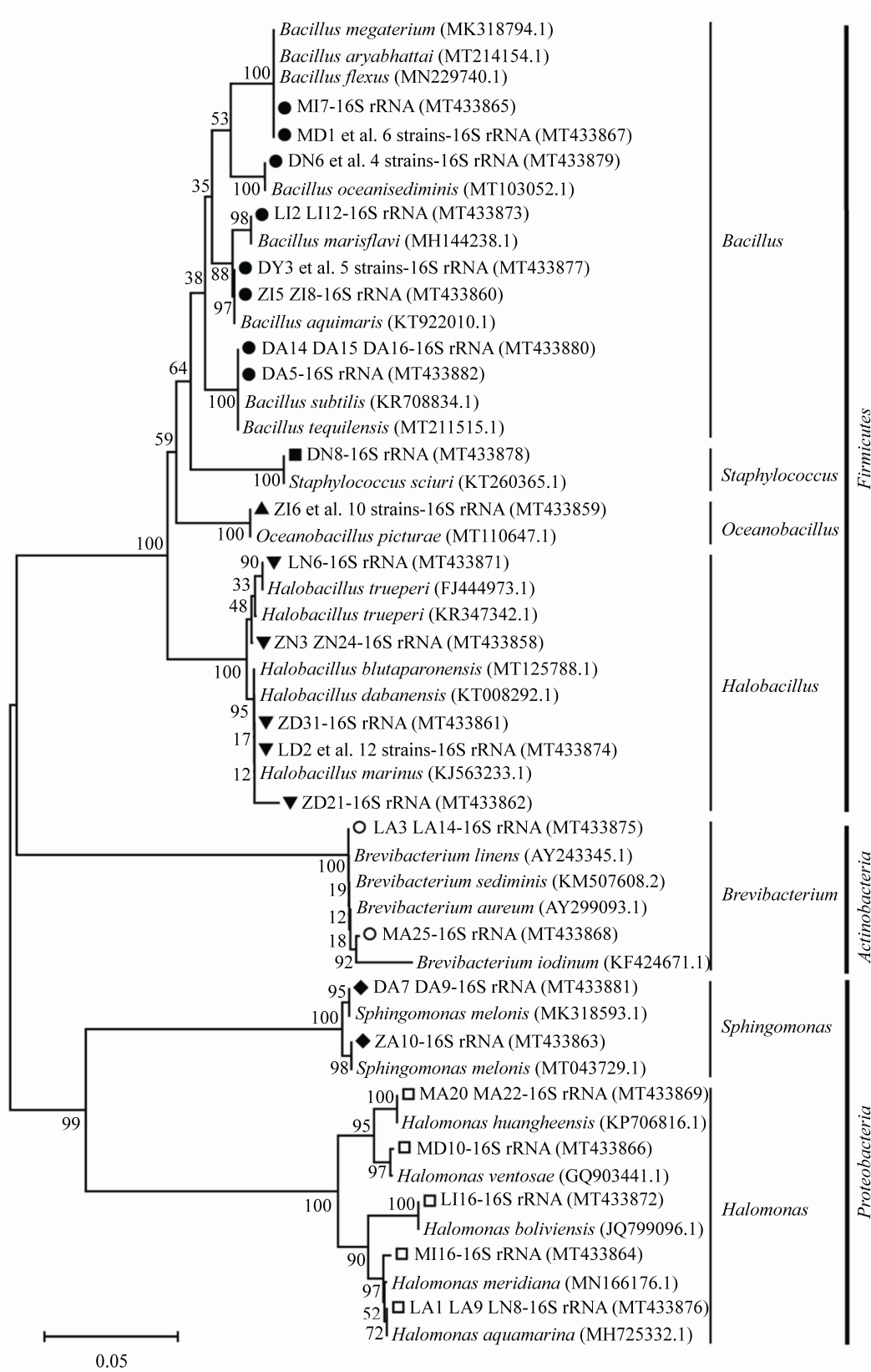
Phylum	Genus	Strain	Accession No. (GenBank)	Reference accession No. (GenBank)	Similarity (%)	Reference species
Firmicutes	<i>Bacillus</i>	MD1, etc. 6 strains	MT433867	MT120178.1	99.44	<i>Bacillus zanthoxyli</i>
	<i>Bacillus</i>	MI7	MT433865	MT120178.1	99.30	<i>Bacillus zanthoxyli</i>
	<i>Bacillus</i>	ZI5, ZI8	MT433860	KT922010.1	100	<i>Bacillus aquimaris</i>
	<i>Bacillus</i>	DY3, etc. 5 strains	MT433877	KT922010.1	100	<i>Bacillus aquimaris</i>
	<i>Bacillus</i>	DN6, etc. 4 strains	MT433879	MT103052.1	100	<i>Bacillus oceanisediminis</i>
	<i>Bacillus</i>	DA5	MT433882	MT211515.1	100	<i>Bacillus tequilensis</i>
	<i>Bacillus</i>	DA14, etc. 3 strains	MT433880	KR708834.1	99.06	<i>Bacillus velezensis</i>
	<i>Bacillus</i>	LI2, LI12	MT433873	MH144238.1	100	<i>Bacillus marisflavi</i>
	<i>Oceanobacillus</i>	ZI6, etc. 10 strains	MT433859	MT110647.1	100	<i>Oceanobacillus picturatae</i>
	<i>Staphylococcus</i>	DN8	MT433878	KT260365.1	100	<i>Staphylococcus sciuri</i>
	<i>Halobacillus</i>	LN6	MT433871	FJ444973.1	99.93	<i>Halobacillus trueperi</i>
	<i>Halobacillus</i>	ZN3, ZN24	MT433858	KJ563233.1	99.01	<i>Halobacillus marinus</i>
	<i>Halobacillus</i>	ZD31	MT433861	KJ563233.1	100	<i>Halobacillus marinus</i>
	<i>Halobacillus</i>	ZD21	MT433862	KJ563233.1	99.58	<i>Halobacillus marinus</i>
	<i>Halobacillus</i>	LD2, etc. 12 strains	MT433874	KJ563233.1	100	<i>Halobacillus marinus</i>
	Proteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	ZA10	MT433863	MT043729.1	99.40
<i>Sphingomonas</i>		DA7, DA9	MT433881	MK318593.1	99.85	<i>Sphingomonas melonis</i>
<i>Halomonas</i>		MA20, MA22	MT433869	KP706816.1	99.49	<i>Halomonas huangheensis</i>
<i>Halomonas</i>		MI16	MT433864	MN166176.1	99.03	<i>Halomonas meridiana</i>
<i>Halomonas</i>		LN8	MT433870	MN166176.1	99.50	<i>Halomonas meridiana</i>
<i>Halomonas</i>		MD10	MT433866	GQ903441.1	99.84	<i>Halomonas ventosae</i>
<i>Halomonas</i>		LA1, LA9	MT433876	MH725332.1	100	<i>Halomonas aquamarina</i>
<i>Halomonas</i>		LI16	MT433872	JQ799096.1	99.79	<i>Halomonas boliviensis</i>
Actinobacteria		<i>Brevibacterium</i>	MA25	MT433868	KF424671.1	99.58
	<i>Brevibacterium</i>	LA3, LA14	MT433875	KM507608.2	99.98	<i>Brevibacterium sediminis</i>

### 3 讨论与结论

我国有着盐湖、盐碱地、晒盐场以及盐岩矿等丰富多样的富盐极端环境，这些富盐环境为开展嗜盐微生物的研究提供了极佳的研究材料。河南叶县(石膏型卤水)因岩盐品味居全国之首，被誉为“中国岩盐之都”。然而，其相关微生物的研究未见报道。为了开发和利用岩盐嗜盐微生物资源，采用AOM、NHM、dmMA和ISP3四种培养基分别在5%和10%两种盐度下，初步探讨了河南叶县岩盐的卤水和盐土中可培养中度嗜盐菌的多样性。分离到的78株细菌归类于厚壁菌门、变形菌门和放线菌门，这与陈义光等<sup>[14]</sup>对一平浪盐矿(硫酸钠型卤水)古老岩盐沉积物的研

究、肖炜等<sup>[13]</sup>对昆明盐矿古老岩盐沉积物的研究一致，甚至与沈硕<sup>[30]</sup>对青藏高原察尔汗盐湖地区可培养中度嗜盐菌的研究也一致，表明地下盐矿以及地表盐湖的微生物类群在门水平上存在一定的一致性。

差异主要表现在属水平。我们分离到了葡萄球菌(*Staphylococcus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)的成员，这些微生物在岩盐微生物相关研究中还未见报道。短杆菌属(*Brevibacterium*)是海洋放线菌目中的稀有菌属之一，存在于热泉<sup>[31]</sup>、深海海泥<sup>[32]</sup>、海洋沉积物<sup>[33]</sup>等多种环境。唐树戈等<sup>[34]</sup>在滨海湿地分离到短杆菌属的菌株，并且发现它们具有耐盐和



**图 1 河南叶县岩盐可培养中度嗜盐菌基于细菌16S rRNA基因的NJ系统发育树**  
**Figure 1 Phylogenetic NJ tree of culturable moderate halophilic bacteria isolated from rock salt from Yexian county in Henan based on 16S rRNA gene**  
 注: 括号中是16S rRNA基因的GenBank登录号; 竖线后表示属, 门类后表示属, 门分类阶元; 节点上的数字表示Bootstrap值; ●: Bacillus分离株; ■: Staphylococcus分离株; ▲: Oceanobacillus分离株; ▼: Halobacillus分离株; ◆: Sphingomonas分离株; ◇: Sphingomonas分离株; ○: Halomonas分离株。  
 Note: GenBank accession number of 16S rRNA gene were given in the parentheses; The taxon of genus and phylum were given after the vertical line; The numbers at the branch point represented the bootstrap value; ●: Bacillus isolates; ■: Staphylococcus isolates; ▲: Oceanobacillus isolates; ▼: Halobacillus isolates; ◆: Sphingomonas isolates; ◇: Sphingomonas isolates; ○: Halomonas isolates.

耐碱的特性。在盐湖、晒盐场等富盐环境下存在丰富的放线菌资源<sup>[2]</sup>，但是在岩盐矿中很少分离到短杆菌(*Brevibacterium*)。鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)广泛分布于水体、土壤、空气以及极端环境<sup>[35]</sup>，甚至昆虫肠道<sup>[36]</sup>，我们在岩盐矿中也分离到该属细菌。鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)可以耐受极端营养贫瘠，可以利用各种简单分子，还可以降解复杂有机物例如芳香类化合物等，该属的部分种还可以合成结冷胶和 $\beta$ -胡萝卜素等，具有良好的应用价值。短杆菌属和鞘氨醇单胞菌属分离株的生理特性是我们下一步研究的重点。葡萄球菌是临床上常见的病原菌，因基因变异导致耐药而著称。在舟山的海泥<sup>[37]</sup>、青藏高原的盐湖<sup>[30]</sup>以及豫东的盐碱地<sup>[38]</sup>等环境中都分离出葡萄球菌，它们对盐具有一定的耐受性。葡萄球菌(*Staphylococcus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)的发现表明了叶县岩盐蕴含着独特的微生物资源。

我们还分离到了 *Halobacillus*、*Bacillus*、*Oceanobacillus* 和 *Halomonas* 等 4 个属的细菌，这些细菌是晒盐场、盐湖以及盐矿等富盐环境常见的微生物类群。沈硕<sup>[30]</sup>采用 8 种培养基在 28 °C 和 37 °C 分离和培养了青藏高原察尔汗盐湖的中度嗜盐菌，*Bacillus*、*Oceanobacillus* 和 *Halomonas* 具有较高丰度。我们也分离到了多个 *Halomonas* 类群，并且 *Bacillus* 在分离到的菌属中占有较高丰度。与陈礼楠等<sup>[18]</sup>对安徽定远盐矿盐土和卤水、田新朋等<sup>[12]</sup>对云南黑井古盐矿的盐土、陈义光等<sup>[14]</sup>对一平浪盐矿沉积物以及肖炜等<sup>[13]</sup>对昆明盐矿沉积物的研究相比较，大量的嗜盐古菌和嗜盐细菌如 *Halospina*、*Pseudomonas* 等菌属在本研究中并未发现。我们的结果与沈硕对盐湖的研究<sup>[30]</sup>类似而与肖炜等对盐矿的研究<sup>[12-14,18]</sup>迥异的原因，可能是嗜盐古菌和极端嗜盐的细菌需要 20%–25% 的盐度，甚至是饱和的盐水<sup>[39]</sup>，而我们采用的是 5% 和 10% 的盐度。

另外，在培养基方面：AOM 和 NHM 是常用的嗜盐微生物分离培养中使用的培养基<sup>[22-23]</sup>，本研究发现，在 4 种培养基分离到的 3 个门 7 个属的微生物中，这 2 种培养基分离到了 3 个门 6 个属的微生物，也就是说，这两种培养基具有良好的覆盖度，这一发现为后续岩盐微生物的分离与鉴定提供了培养基的支持。ISP 系列的培养基主要用于土壤、高盐环境、植物内生放线菌的分离与鉴定<sup>[24]</sup>。本研究中，使用 ISP3 培养基没有更好的发现，甚至没有分离到放线菌，然而仅有该培养基分离到了 *Oceanobacillus* 的微生物；虽然报道称 dmMA 可以分离到许多新的种甚至属<sup>[25]</sup>，但是我们的研究发现，该培养基仅仅分离到了 *Halomonas*、*Bacillus* 和 *Halobacillus* 3 个属的微生物；ISP3 和 dmMA 没有表现出文献报道的结果，可能跟我们使用的盐度(中度，5%和 10%)有关，在更高盐度(>25%)的情况下，ISP3 和 dmMA 可能会分离到更为特殊的微生物。

本文采用传统分离和培养的方法揭示了河南叶县岩盐中度嗜盐菌的多样性，发现该地与盐湖、盐碱地、晒盐场以及盐岩矿等富盐极端环境的微生物相比存在较大的差异，并且获得了宝贵的岩盐微生物资源，为进一步研究岩盐微生物在复杂高盐环境下的代谢特征、生物学适应机制和酶制剂开发，以及探索岩盐形成中的生物学过程提供了理想的研究材料。当然，为了进一步了解叶县岩盐微生物的多样性，除了采用更高盐度的培养基从盐芯、盐结晶里面分离和培养嗜盐古菌和极端嗜盐细菌之外，我们正在采用高通量测序的技术深入研究。

致谢：感谢云南省微生物研究所的唐蜀昆老师、江苏大学的崔恒林老师和山东大学的穆大帅老师在培养基方面给予的帮助。

## REFERENCES

- [1] Hao C, Tang B, Tang XF. Recent progress in industrial application of halophiles[J]. Biotic Resources, 2019, 41(4): 281-288 (in Chinese)



- 郝闯, 唐兵, 唐晓峰. 嗜盐微生物的工业应用研究及进展[J]. 生物资源, 2019, 41(4): 281-288
- [2] Guan TW, Che ZM, Xiang WL, et al. Actinobacterial community structure in sediment from Lop Nur Salt Lake[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2013, 19(3): 466-470 (in Chinese)  
关统伟, 车振明, 向文良, 等. 罗布泊盐湖沉积物放线菌的群落结构[J]. 应用与环境生物学报, 2013, 19(3): 466-470
- [3] Cao LL, Wang Y, Tang SK, et al. Biodiversity and enzyme screening of actinomycetes from Hami Lake[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(3): 287-293 (in Chinese)  
曹兰兰, 王芸, 唐蜀昆, 等. 新疆哈密地区盐湖放线菌的多样性及其功能酶的筛选[J]. 微生物学报, 2009, 49(3): 287-293
- [4] Zhao Y, He CX, Yang GZ, et al. Isolation of salt-tolerant microorganisms from Qinghai lake and the effect of degradation rate on salt-alkali[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(13): 16-19,240 (in Chinese)  
赵媛, 何彩霞, 杨国柱, 等. 青海湖耐盐微生物分离及对盐碱降解率的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(13): 16-19,240
- [5] Zhang XH, Kong FJ. Bacterial diversity in Zabuye Salt Lake of Tibet by culture-independent approaches[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(3): 334-341 (in Chinese)  
张现辉, 孔凡晶. 西藏扎布耶盐湖细菌多样性的免培养技术分析[J]. 微生物学报, 2010, 50(3): 334-341
- [6] Yang L, Yin TT, Yin X, et al. Analysis on the bacterial community composition of Muzhou Nuocer Salt Lake in Inner Mongolia based on high-throughput sequencing[J]. Sichuan Environment, 2015, 34(6): 34-38 (in Chinese)  
杨丽, 殷婷婷, 尹馨, 等. 基于高通量测序的内蒙古姆州诺尔盐湖细菌群落组成分析[J]. 四川环境, 2015, 34(6): 34-38
- [7] Chen R, Li Y, Han LP, et al. Isolation and identification of halophilic bacteria A393 from Dingbian Salt Lake[J]. Journal of Microbiology, 2012, 32(5): 28-31 (in Chinese)  
陈锐, 李玥, 韩丽萍, 等. 陕西定边盐湖嗜盐菌 A393 的分离及其种属鉴定[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(5): 28-31
- [8] Liu YF. Isolation, screening and optimization of fermentation of fermentation conditions for the multi-functional and salt tolerant bacteria in Saline Lake of Yuncheng[D]. Linfen: Master's Thesis of Shanxi Normal University, 2016 (in Chinese)  
刘艳芳. 运城盐湖多功能中度嗜盐菌的分离筛选及发酵条件优化[D]. 临汾: 山西师范大学硕士学位论文, 2016
- [9] Wang XT, Yang DD, Nie D, et al. Isolation and screening of antimicrobial activity of moderately halophiles from the Daishan Solar Saltern[J]. Bulletin of Science and Technology, 2016, 32(3): 63-69 (in Chinese)  
汪雪婷, 杨丹丹, 聂都, 等. 岱山盐田中度嗜盐菌的分离及抗菌活性筛选[J]. 科技通报, 2016, 32(3): 63-69
- [10] Zhou XH, Wang Y, Wu M. Isolation and exopolysaccharide screening of halophiles from Zhoushan Islands[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2007, 34(3): 335-339 (in Chinese)  
周旭华, 王勇, 吴敏. 舟山地区嗜盐菌的分离和产胞外多糖菌株的筛选[J]. 浙江大学学报: 理学版, 2007, 34(3): 335-339
- [11] Xia ZY, Liu ZG, Li SM, et al. Origin and developing model of rock salt: a case study of Lower Ganchaigou Formation of Paleogene in the west of Yingxiong ridge, Qaidam Basin[J]. Acta Petrolei Sinica, 2017, 38(1): 55-66 (in Chinese)  
夏志远, 刘占国, 李森明, 等. 岩盐成因与发育模式——以柴达木盆地英西地区古近系下干柴沟组为例[J]. 石油学报, 2017, 38(1): 55-66
- [12] Tian XP, Zhang YQ, Tang SK, et al. Culture-dependent extremely halophilic archaea isolated from Heijing Ancient Salt Mine, Yunnan[J]. Microbiology China, 2006, 33(6): 1-7 (in Chinese)  
田新朋, 张玉琴, 唐蜀昆, 等. 云南黑井古盐矿可培养极端嗜盐古菌初步研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 1-7
- [13] Xiao W, Yang YL, Liu HW, et al. Culturable bacterial diversity of the ancient salt deposits in the Kunming Salt Mine, P. R. China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(6): 967-972 (in Chinese)  
肖炜, 杨亚玲, 刘宏伟, 等. 昆明盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌多样性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 967-972
- [14] Chen YG, Li HM, Li QY, et al. Phylogenetic diversity of culturable bacteria in the ancient salt deposits of the Yipinglang Salt Mine, P. R. China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(4): 571-577 (in Chinese)  
陈义光, 李汇明, 李沁元, 等. 一平浪盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌的系统发育多样性研究[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 571-577
- [15] Gramain A, Díaz GC, Demergasso C, et al. Archaeal diversity along a subterranean salt core from the Salar Grande (Chile)[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(8): 2105-2121
- [16] Xiao W, Wang ZG, Wang YX, et al. Comparative molecular

- analysis of the prokaryotic diversity of two salt mine soils in Southwest China[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53(11): 942-952
- [17] Chen SX, Liu HC, Zhao DH, et al. *Halorubrum yunnanense* sp. nov., isolated from a subterranean salt mine[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(12): 4526-4532
- [18] Chen LN, Li F, Sun SQ, et al. Species diversity of culturable halophilic microorganisms isolated from Dingyuan salt mine, Anhui[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(9): 2186-2197 (in Chinese)  
陈礼楠, 李峰, 孙思琪, 等. 安徽定远盐矿可培养嗜盐微生物多样性[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(9): 2186-2197
- [19] Kong M, Shi WZ, Song ZF, et al. The response relation between salt sediment and tectonic activity in Wuyang Depression[J]. *Acta Sedimentologica Sinica*, 2010, 28(2): 299-306 (in Chinese)  
孔敏, 石万忠, 宋志峰, 等. 舞阳凹陷盐岩沉积与构造的响应关系[J]. *沉积学报*, 2010, 28(2): 299-306
- [20] Tong ZD, Zhang J, Zhou ZJ, et al. Zircon U-Pb dating and Hf isotope compositions of the volcanic rocks from the bottom of the Wuyang Sag, Henan province[J]. *Geotectonica et Metallogenia*, 2016, 40(3): 588-600 (in Chinese)  
佟子达, 张静, 周振菊, 等. 河南舞阳凹陷底部火山岩的发现及其锆石年代学和 Hf 同位素地球化学研究[J]. *大地构造与成矿学*, 2016, 40(3): 588-600
- [21] Jia HY. Ye Xian made every effort to build "China's rock salt city"[J]. *Resource Guide*, 2007(12): 33 (in Chinese)  
贾洪毅. 叶县全力打造“中国岩盐之都”[J]. *资源导刊*, 2007(12): 33
- [22] Xu JQ, Xu WM, Li Y, et al. *Halorussus salinus* sp. nov., isolated from a marine solar saltern[J]. *Archives of Microbiology*, 2016, 198: 957-961
- [23] Zhou Y. Biodiversity and extracellular protease of cultured halophilic archaea isolated from saline environment in Xinjiang[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2018 (in Chinese)  
周瑶. 新疆地区盐碱环境嗜盐古菌多样性与产胞外蛋白酶研究[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2018
- [24] Guan TW. Actinomycetes of China Salt Lakes[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2017 (in Chinese)  
关统伟. 中国盐湖放线菌[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2017
- [25] Sang J. Analysis of bacterial diversity in Yuncheng salt lake and polyphasic taxonomy of four novel halophilic bacteria[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2018 (in Chinese)  
桑进. 运城盐湖嗜盐细菌多样性分析及四株嗜盐新菌的多相分类[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2018
- [26] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613-1617
- [27] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739
- [28] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425
- [29] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791
- [30] Shen S. Community structure and diversity of culturable moderate halophilic bacteria isolated from Qrhan Salt Lake on Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(4): 490-499 (in Chinese)  
沈硕. 青藏高原察尔汗盐湖地区可培养中度嗜盐菌的群落结构与多样性[J]. *微生物学报*, 2017, 57(4): 490-499
- [31] Wang S, Lin XZ, Huang XH, et al. Screening and characterization of a crude thermophilic alkaline protease from an isolated strain of *Brevibacillus* PBI in Indonesia's hot spring[J]. *Advances in Marine Science*, 2012, 30(2): 244-251 (in Chinese)  
王帅, 林学政, 黄晓航, 等. 印尼热泉中产嗜热碱性蛋白酶菌株筛选及酶学性质研究[J]. *海洋科学进展*, 2012, 30(2): 244-251
- [32] Bhadra B, Raghukumar C, Pindi PK, et al. *Brevibacterium oceani* sp. nov., isolated from deep-sea sediment of the Chagos Trench, Indian Ocean[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(1): 57-60
- [33] Liu SS. Screening and identification on the microorganism with potential applications from the East Sea[D]. Shanghai: Master's Thesis of Donghua University, 2010 (in Chinese)  
刘双霜. 东海海域具潜在应用价值的微生物筛选与鉴定[D]. 上海: 东华大学硕士学位论文, 2010
- [34] Tang SG, Zhang L, Yu JC, et al. Polyphasic taxonomy of a rare marine actinomycetes[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2014, 45(1): 33-36 (in Chinese)

- 唐树戈, 张柳, 于基成, 等. 1 株湿地稀有放线菌的多相分类鉴定[J]. 沈阳农业大学学报, 2014, 45(1): 33-36
- [35] Hu J, He XH, Li DP, et al. Progress in research of *Sphingomonas*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2007, 13(3): 431-437 (in Chinese)  
胡杰, 何晓红, 李大平, 等. 鞘氨醇单胞菌研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 431-437
- [36] Zhang K, Su ZP, Xu Y, et al. Isolation and identification of cellulose-degrading bacteria in the posterior intestine[J]. Biotic Resources, 2020, 42(2): 228-233 (in Chinese)  
张科, 苏智鹏, 许阳, 等. 蟋蟀后肠纤维素降解细菌的分离与鉴定[J]. 生物资源, 2020, 42(2): 228-233
- [37] Wang CD, Chen P, Yan X, et al. The 16S rRNA gene sequence analysis of a strain halophilic bacteria[J]. Biotechnology, 2008, 18(6): 1-3 (in Chinese)
- 汪长东, 陈鹏, 闫旭, 等. 一株嗜盐细菌的 16S rRNA 基因序列分析[J]. 生物技术, 2008, 18(6): 1-3
- [38] Wei WQ, Xing WW, Yu YY, et al. Isolation and identification of a halotolerant *Staphylococcus* strain[J]. Journal of Henan University (Medical Science), 2014, 33(3): 185-187 (in Chinese)  
卫文强, 邢伟伟, 于运运, 等. 一株耐盐葡萄球菌的分离与鉴定[J]. 河南大学学报: 医学版, 2014, 33(3): 185-187
- [39] Liu BB, Tang SK, Ming H, et al. Biodiversity and functional enzymes of cultured halophilic archaeon in Lop Nur region[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(9): 1222-1231 (in Chinese)  
刘冰冰, 唐蜀昆, 明红, 等. 新疆罗布泊地区可培养嗜盐古菌多样性及其功能酶筛选[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1222-1231

## 编辑部公告

## 邀请您关注《微生物学通报》公众微信号

为了更好地与读者、作者、审稿专家和编委朋友们及时沟通、方便服务,《微生物学通报》已开通公众微信服务号。作者通过微信能及时收到稿件各流程通知,第一时间了解稿件进程并及时处理;审稿专家和编委可通过微信及时收到审稿邀请,还可通过手机审稿;读者通过微信可了解《微生物学通报》文章目录,查找阅读感兴趣的文章。

## 关注办法:

- 1、在微信公众号搜索“微生物学通报”或“wswxtb”;
- 2、用微信扫右边二维码:

