

# 连云港台北盐场嗜盐古菌多样性研究

薛梦颖,殷婷婷,丁丽燕,王 宇,齐 婕,杨 丽,温洪宇

(江苏师范大学 生命科学学院,江苏 徐州 221116)

**摘要:**为了保护 and 开发微生物资源,从连云港台北盐场采集卤水,通过分离筛选获得 5 株嗜盐古菌,编号分别为 23、25、40、174 和 178,均为革兰氏阴性,杆状。用嗜盐古菌 16 S rRNA 基因通用引物进行 16 s rRNA 基因扩增,克隆后测序,对测序结果进行系统发育学分析研究并构建系统发育树。结果表明:嗜盐古菌菌株 23、40、174 和 178 属于盐红杆菌属(*Halorubrum*),25 属于盐盒菌属(*Haloarcula*)。

**关键词:**嗜盐古菌;16S rRNA 基因;PCR;克隆;系统发育树

**中图分类号:**Q938.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1002-2767(2013)09-0091-03

我国有着丰富的高盐环境资源,西北部的新疆、青海和内蒙等地存在 800 多个内陆盐湖<sup>[1]</sup>,东南沿海也分布着数百个盐场,在这些高盐环境中存在着大量的嗜盐细菌和嗜盐古菌。近几年,前人对新疆、内蒙古和西藏等地的嗜盐微生物资源进行了大量的研究<sup>[2-4]</sup>。随着细胞生物学、分子生物学等学科的迅速发展,嗜盐古菌独特的细胞结构、生理机能和代谢机制等得到了进一步的揭示<sup>[5-8]</sup>,与此同时,嗜盐古菌在现代分子生物学、生物电子、医学和工业生产等方面的广泛应用前景<sup>[9-10]</sup>也越来越受到人们的重视。

前人对我国东南盐田嗜盐古菌的研究较少,加之土地紧缺,嗜盐微生物的生存环境遭到破坏,大量的嗜盐微生物资源逐渐灭绝,因此,对嗜盐微生物的开发与研究具有紧迫性。该文从我国东部沿海的连云港台北盐场采取卤水样,分离纯化后获得 5 株嗜盐古菌,编号分别为 23、25、40、174 和 178,对其进行 16SrRNA 基因序列扩增测序,得到的序列与相似性序列构建分子发育树,然后进行同源性比较和系统发育学分析,研究结果为揭示连云港盐田嗜盐古菌的多样性与应用研究提供了基因和物种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株 从连云港台北盐场采集卤水,分离到 5 株嗜盐古菌菌株,编号分别为 23、25、40、174

和 178。

1.1.2 培养基 酵母膏 10 g、蛋白胨 7.5 g、柠檬酸三钠 3 g、NaCl 200 g、KCl 2 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 g、水 1 000 mL、琼脂粉 20 g(固体培养基),pH 7.0,121℃灭菌 25 min 后备用<sup>[11]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化 用稀释涂布法将卤水水样稀释后涂布于平板上,挑取单一菌落,进一步反复划线分离,直至获得纯菌株。获得 5 株嗜盐古菌,编号分别为 23、25、40、174 和 178,平板接种纯化后的古菌菌株,37℃条件下 7 d 后观察单菌落形态特征。

1.2.2 基因组总 DNA 的抽提 采用 UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒(购自上海生工生物工程技术有限公司)进行提取。

1.2.3 基因组总 DNA 电泳分析 取 3 μL 基因组进行琼脂糖凝胶电泳。电泳条件为:1%的琼脂糖凝胶,70 V 电压,30 min。利用 BIO-RAD 凝胶成像系统记录结果。

1.2.4 16S rRNA 的 PCR 扩增 PCR 反应体系(25 μL):模板 DNA 1.5 μL、上下游引物各 0.5 μL、10×PCR Buffer 2.5 μL、Mg<sup>2+</sup> 2 μL、dNTPs 0.75 μL、Taq DNA Polymerase 0.15 μL、ddH<sub>2</sub>O 17.1 μL。正向引物 H21F 序列为 5' TTCCGGTTGATCCTGCCGGA3';反向引物 H1540R 序列为 5' AGGAGGTGATCCAGCCG-CAG3'。

PCR 条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃延伸 10 min,PCR 扩增产物于 4℃保存。

1.2.5 PCR 产物电泳分析 取 3 μL PCR 产物

收稿日期:2013-04-15

第一作者简介:薛梦颖(1991-),女,江苏省南京市人,在读学士,从事环境微生物学的研究。E-mail:xuemy21@126.com。

通讯作者:温洪宇(1973-),男,山西省定襄县人,博士,副教授,从事环境微生物学研究。E-mail:wenhy2007@126.com。

进行琼脂糖凝胶电泳。电泳条件为:1%的琼脂糖凝胶,70 V电压,30 min。利用 BIO-RAD 凝胶成像系统记录结果。

1.2.6 PCR 产物胶回收 采用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒(购自上海生工生物工程技术服务有限公司),回收琼脂糖凝胶中的 PCR 扩增后的目的产物,并保存于-20℃备用。

1.2.7 pMD 18-T Vector 的连接和转化 用载体 pMD18-T Vector 连接 16S rRNA 目的基因并转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,蓝白斑筛选后挑取白色菌落摇菌后进行 PCR 检测。

1.2.8 16S rRNA 基因测序 由南京斯普金生物科技有限公司进行测序。

1.2.9 系统发育树构建 利用 NCBI 中的 BLAST 软件对测定的嗜盐古菌 23、25、40、174 和 178 的 16S rDNA 序列与相似菌株进行同源性比较,通过软件 Clustalx1.83 与 MEGA4.0 中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树<sup>[12-13]</sup>,重复取样 1 000 次,评估其稳定性。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌落与菌体形态

分离纯化得到的 5 株嗜盐古菌,编号分别为 23、25、40、174 和 178。菌株细胞形态都为杆状,革兰氏染色阴性,菌落红色,边缘整齐。

### 2.2 菌株 16S rRNA 基因序列分析

对 5 株嗜盐古菌 23、25、40、174 和 178 进行测序与序列分析后,分别获得 1 473、1 472、1 472、1 469 和 1 469 bp 的有效核酸序列。

### 2.3 与相近物种的系统发育学分析

基于 16S rRNA 基因序列对古菌 23、40、174 和 178 与亲缘关系近的模式菌株构建的分子发育树(见图 1),结果表明嗜盐古菌 40 与模式菌株 *Halorubrum xinjiangense* JCM12388 (Genbank 登录号:AY510707)聚为一支,置信度为 87%,16S rRNA 基因序列的相似性为 99.183%,初步确定嗜盐古菌 40 属于盐红杆菌属(*Halorubrum*),命名为 *Halorubrum* sp. 40;嗜盐古菌 23 与模式菌株 *Halorubrum litoreum* Fa-1 (Genbank 登录号:EF028067)聚为一支,置信度为 76%,16S rRNA 基因序列的相似性为 99.523%,初步确定嗜盐古菌 23 属于盐红杆菌属(*Halorubrum*),命名为 *Halorubrum* sp. 23;嗜盐古菌 174 与模式菌株 *Halorubrum orientale* EJ-52T (Genbank 登录号:AM235786)聚为一支,置信度为 100%,16S rRNA 基因序列的相似性为 99.148%,初步确定嗜盐古菌 174 属于盐红杆菌属(*Halorubrum*),命名为 *Halorubrum* sp. 174;嗜盐古菌 178 与模式菌株 *Halorubrum kocurii* BG-1T (Genbank 登录号:AM900832)聚为一支,

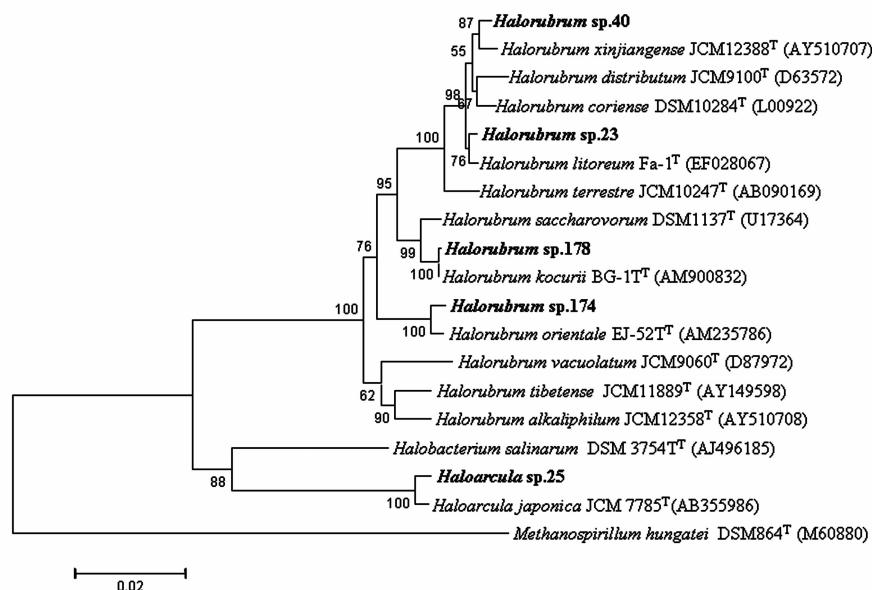


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的分子发育树

Fig. 1 Molecular phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

置信度为 100%, 16S rRNA 基因序列的相似性为 99.927%, 初步确定嗜盐古菌 178 属于盐红杆菌属 (*Halorubrum*), 命名为 *Halorubrum* sp. 178; 嗜盐古菌 25 与模式菌株 *Haloarcula japonica* JCM 7785 (Genbank 登录号: AB355986) 聚为一支, 置信度为 100%, 16S rRNA 基因序列的相似性为 99.048%, 初步确定嗜盐古菌 25 属于盐盒菌属 (*Haloarcula*), 命名为 *Haloarcula* sp. 25。

### 3 结论与讨论

通过构建 16S rRNA 基因序列的系统发育树, 来判断微生物物种之间亲缘关系的远近, 一般同源性在 98% 以下, 可认为属于不同种, 同源性在 93%~95%, 可认为属于不同属<sup>[14]</sup>。该研究中, 嗜盐古菌与其同源性最近物种的 16S rRNA 序列所构建的系统发育树, 表明嗜盐古菌菌株 23、40、174 和 178 属于盐红杆菌属 (*Halorubrum*), 菌株 25 属于盐盒菌属 (*Haloarcula*)。嗜盐菌广泛分布于盐湖、盐田和高盐度环境中, 是极端微生物常见类群之一。对于连云港地区天然盐场中嗜盐古菌和嗜盐细菌的遗传资源研究, 可以提高盐田的海盐质量和产量, 对于丰富和完善我国的嗜盐菌物种资源具有很重大的意义和应用价值。

#### 参考文献:

- [1] 郑喜玉, 张明刚, 徐昶, 等. 中国盐湖志 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 4-6.
- [2] 许学伟, 吴敏, 迪丽拜尔·托乎提, 等. 新疆艾比湖和伊吾湖可培养嗜盐古菌多样性 [J]. 生物多样性, 2006, 14 (4): 359-362.
- [3] 潘海莲, 周成, 王红蕾, 等. 内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性的研究 [J]. 微生物学报, 2006, 46 (1): 1-6.
- [4] 范华鹏, 薛燕芬, 曾艳, 等. 西藏扎布耶茶卡盐碱湖古菌多样性的非培养技术分析 [J]. 微生物学报, 2003, 43 (4): 401-408.
- [5] 沈露露, 韩征, 温洪宇, 等. 嗜盐菌株 LYG86 16SrDNA 序列克隆及系统发育学分析 [J]. 江苏农业科学, 2010 (6): 39-41.
- [6] 陈绍兴, 刘朝茂, 杨建, 等. 嗜盐古菌 *Halorubrum* sp. CY 的分离、鉴定及胞外淀粉酶特性初步研究 [J]. 微生物学通报, 2009, 36 (7): 949-955.
- [7] 张帆, 张兵, 向华, 等. 极端嗜盐古菌中 CRISPR 结构的生物信息学分析 [J]. 微生物学通报, 2009, 49 (11): 1445-1453.
- [8] 苗获, 孙超岷, 向华, 等. 极端嗜盐古菌质粒 pSCM201 衍生穿梭表达载体的构建及应用 [J]. 微生物学通报, 2009, 49 (8): 1040-1047.
- [9] 何敏艳, 邹正中, 蔡林王, 等. 连云港台北和盐城三圩盐田土壤嗜盐菌多样性研究 [J]. 微生物学报, 2008, 35 (5): 737-742.
- [10] Xu Y, Zhou P J, Tian X Y. Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Naoortnorubrum tibetense* gen. nov [J]. Int. J. Syst. Bacteriol., 1994, 49: 261-266.
- [11] 沈露露, 韩征, 温洪宇, 等. 嗜盐菌株 LYG86 16S rDNA 序列克隆及系统发育学分析 [J]. 江苏农业科学, 2010 (6): 39-41.
- [12] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree [J]. Mol. Biol. Evol., 1987, 4: 406-425.
- [13] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39: 783-791.
- [14] 王振雄, 徐毅, 周培瑾. 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究 [J]. 微生物学报, 2000, 40 (2): 115-120.

## Diversity Research on Halophilic Archaea of Taibei Saltern in Lianyungang

XUE Meng-ying, YIN Ting-ting, DING Li-yan, WANG Yu, QI Jie, YANG Li, WEN Hong-yu

(School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116)

**Abstract:** For the protection and development of microbial resources, five halophilic archaea strains numbered 23, 25, 40, 174 and 178 which are Gram-negative and rod-shaped were isolated from Taibei saltern of Lianyungang. 16S rRNA genes were obtained by PCR with archaea universal primers of 16S rRNA gene. After cloning and sequencing, compared the nucleotide sequences with closely species were phylogenetic analyzed and phylogenetic trees were constructed. The results showed that halophilic archaea strains 23, 40, 174 and 178 belonged to genus *Halorubrum*, and strain 25 belonged to genus *Haloarcula*.

**Key words:** halophilic archaea; 16S rRNA gene; PCR; clone; phylogenetic tree