

天津团泊湖地区盐碱土壤中可培养微生物群落结构和归属分析

冯伟, 孙瑞, 高广海, 王莹莹*

(南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300071)

摘要: 为了解天津团泊湖地区盐碱土中可培养耐盐碱细菌的多样性, 以 Horikoshi II 为基础培养基, 在 pH 7~9.5、NaCl 浓度 0~15% 范围内, 对天津团泊湖地区盐碱土土壤样品中可培养耐盐碱细菌进行分离, 并对它们进行 16S rDNA 序列测定和系统进化分析, 共得到不同表型的细菌 75 株。结果表明, 这些分离菌株分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、海洋芽孢杆菌属(*Oceanobacillus*)、鱼露芽孢杆菌属(*Jeotgalibacillus*)和微球菌属(*Micrococcus*)。芽孢杆菌属和海洋芽孢杆菌属是天津团泊湖可培养耐盐碱菌的优势细菌种群, 它们分别占已测种群的 48%(36 株)和 24%(18 株)。大多数菌株与已知的系统发育关系密切的已知典型菌株之间存在一定的遗传差异(16S rDNA 序列的相似性为 99.6%~99.9%), 其中至少有 4 个菌株(TJTB06、TJTB32、TJTB50 和 TJTB51)代表潜在的新菌株。天津团泊湖地区存在较为丰富的耐盐碱菌种群, 并且潜藏着较多的新种源, 极具进一步发掘研究的价值。

关键词: 耐盐碱细菌; 16S rDNA; 系统发育分析; 细菌多样性

中图分类号: S154.36 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)05-1028-08 doi:10.11654/jaes.2013.05.022

Analysis of Cultivable Microbial Community Structure and Affiliation in Saline-Alkaline Soil in the Tuanbo Lake Area of Tianjin, China

FENG Wei, SUN Rui, GAO Guang-hai, WANG Ying-ying*

(Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria (Ministry of Education), Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: In order to reveal the diversity of cultivable haloalkaliphilic bacteria from the Tuanbo Lake Area of Tianjin, we isolated cultivable bacteria using the Horikoshi II medium with varying NaCl concentration (0~15%) and pH (7~9.5). A total of seventy-five halophilic bacteria were isolated from the Tuanbo Lake area. All isolated bacteria were subjected to the 16S rDNA sequence analysis. Five genera including *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Micrococcus*, *Oceanobacillus*, and *Jeotgalibacillus* were identified. *Bacillus* and *Oceanobacillus* are the dominant genera, respectively accounting for 48% and 24% of all isolated bacteria. Based on the similarity of isolated bacteria to known sequences in GenBank (16S rDNA gene sequence similarities ranged from 99.6% to 99.9%), at least four strains (TJTB06, TJTB32, TJTB50 and TJTB51) represent potentially new strains. The results of the study showed that cultivable haloalkaliphilic bacterial populations are quite abundant in the Tuanbo Lake area. It was clear that these haloalkaliphilic bacteria have adapted to the special man-made hypersaline environment by basic physiological evolution during phylogenesis, so they could be determined according to further polyphasic taxonomy data. The current results also indicated a phenotypically and genotypically diverse culture-dependent haloalkaliphilic bacterial community colonizing the Tuanbo Lake area. They provide potentially useful microbial resources, which require further in-depth investigation.

Keywords: haloalkaliphilic; 16S rDNA; phylogenetic analysis; bacterial diversity

收稿日期: 2012-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31000247); 天津市应用基础与前沿技术研究计划资助项目(12JCZDJC29700)

作者简介: 冯伟(1987—), 女, 研究生。E-mail: fengwei1204.cool@163.com

* 通信作者: 王莹莹 E-mail: wangyy@nankai.edu.cn

嗜盐碱菌是极端微生物的一个类群,能在高盐和碱性条件下良好生长^[1]。根据不同耐盐程度,可将其分为轻度、中度和极端嗜盐菌三大类^[2]。1984 年,Tindall 等^[3]分离出第一株嗜盐碱菌,随后该类群的菌株不断被发现^[4-11]。由于嗜盐碱菌独特的耐盐机制、代谢产物的多样性和潜在的应用价值,在过去的几十年内耐盐碱菌受到了广泛的关注。根据联合国教科文组织(UNESCO)和联合国粮食和农业组织(FAO)的不完全统计,全世界盐碱地的面积为 9.543 8 亿 hm^2 ^[12],我国约有盐碱地 9913 万 hm^2 ,主要分布在东北、华北、西北内陆地区及长江以北沿海地区。天津市是中国滨海盐碱地的代表之一,位于华北平原东北部,渤海之滨,全市面积 11 760.26 km^2 ,土壤盐渍化面积 4 220.387 km^2 (全国第二次土壤普查数据),占全市面积的 35.9%,为全国各省市盐碱化程度最大的地区之一^[13]。已有的研究表明,内陆地区高盐环境中存在的微生物区系组成有别于海洋或沿海高盐环境^[14],对这类环境中的微生物进行多样性分析,了解此类环境中的微生物分布情况,是合理开发和利用盐碱地资源的重要前提。

近年来,很多分子生物技术逐渐应用到对自然样本的研究中^[15-17]。基于 16S rDNA 基因序列的细菌群落结构多样性分析已成为研究高盐环境中细菌种类和遗传多样性的一种新的分析手段,已经逐渐被应用到高盐环境下细菌多样性研究^[18-19],并发现了多种新的嗜盐细菌类群。目前,我国如新疆^[20]、西藏和内蒙古等地已展开对耐盐碱菌的调查研究和多样性分析。本研究通过深入揭示天津团泊湖地区嗜盐碱细菌物种及基因资源的多样性,并利用 16S rDNA 作为分子指标对这些菌株进行分类鉴定,为滨海盐碱地微生物修复与生态环境保护提供一定的理论依据和微生物资源。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

主要仪器有 BIO-RAD S1000 PCR 仪、Eppendorf 5810R 离心机、BIO-RAD Gel DOC™ XR+ 成像仪、TaisitDH5000B 恒温培养箱、IS-RSDA 恒温振荡培养箱等;主要试剂有购自 Qiagen 的 DNeasy® Blood & Tissue Kit 土壤菌株 DNA 的提取试剂盒、Promega 公司的 Go Taq® Colorless Master Mix PCR 扩增试剂、引物 1541r、27f 由上海生工合成。

1.2 土样的采集和处理

土壤样品于 2011 年 5 月和 9 月采自天津团泊湖

地区,按照典型区域的采样原则,采集表层(0~30 cm) 11 个土样,团泊湖周边随机设置 6 个采样点,别墅区内 3 个采样点及道路周边两个采样点。样品经过自然风干、拣出枯枝落叶后碾碎,再过 1 mm 筛,于自封袋中 4 ℃ 保存备用。天津市团泊湖地区盐碱土壤的 pH 在 8.3~9.0 之间,均值为 8.43,整体偏高,呈弱碱性;全盐含量在 0.14%~0.39%之间,为轻度至中度盐渍化土壤,一般而言土壤含盐量在 0.1%~0.2%,已有害于作物的生长;土壤有机质含量平均 1.05%,全氮平均值 0.059%,速效磷平均值 14.11 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,根据土壤养分分级指标,分别处于缺乏状态、急缺状态和中等水平。总体而言,天津团泊湖地区土壤盐碱化程度较为严重,土壤有机质含量低。

1.3 菌株分离

以 Horikoshi I^[21]为富集培养基(表 1),取备用土样 10 g 于 90 mL 液体培养基中,30 ℃、150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 48 h 进行富集培养。取富集培养样品 10 mL 于 90 mL 0.8% 的无菌生理盐水中振荡 30 min。以 1/2 Horikoshi II 为分离培养基,取 100 μL 一定稀释梯度样品匀浆涂布于平板,平板培养基的盐度范围是 0~15%,pH 在 7~9.5 之间,平板于 30 ℃ 培养 15 d 左右。根据菌株的形态、颜色、大小和边缘特征挑取不同类型的细菌反复划线纯化,最后得到的菌株 4 ℃ 试管保存。

表 1 富集培养基的组成

Table 1 Composition of the basal medium

组成 Ingredient	含量 Amt/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	
	Horikoshi I	Horikoshi II
葡萄糖 Glucose	10	0
可溶性淀粉 Soluble starch	0	10
酵母粉 Yeast extract	5	5
蛋白胨 Polypeptone	5	5
磷酸氢二钾 K_2HPO_4	1	1
7 水硫酸镁 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	0.2
无水碳酸钠 Na_2CO_3	10	10
琼脂 Agar	20	20

1.4 DNA 提取和 16S rDNA 扩增

将筛选的纯菌于 100 mL 液体 Horikoshi II 富集振荡培养 5 d,按照 DNA 试剂盒提取操作步骤提取纯菌 DNA,4 ℃ 保存备用作为 PCR 的模板^[22]。16S rDNA 扩增采用正向引物 5'-AGAGTTTGA TCATGGCTCAG-3' 和反向引物 5'-AAGGAGG TGATCCAGCCGCA-3' 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系

为 50 μL :1 μL DNA 模板,Go Taq[®] Colorless Master Mix 25 μL ;Nuclease-Free Water 23 μL ;正向引物和反向引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。PCR 扩增条件:预变性条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 min;前 10 个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,65~55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;后 25 个循环 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物经过 EB 染色的 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测后送至天津生物芯片技术有限责任公司测序。

1.5 系统进化树的构建和分析

根据 16S rDNA 序列结果,从 NCBI BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)和 EZTAXON(EzTax-on 2.1)上进行分析。用 CLUSTAL X1.8^[25]进行序列比对,系统进化矩阵根据 Kimura^[27]双参数模型估算。用 MEGA4.0^[26]软件采用邻接法(Neighbor Joining)聚类分析,Bootstrap 按照重复 1000 来计算^[28],并构建出系统发育树。

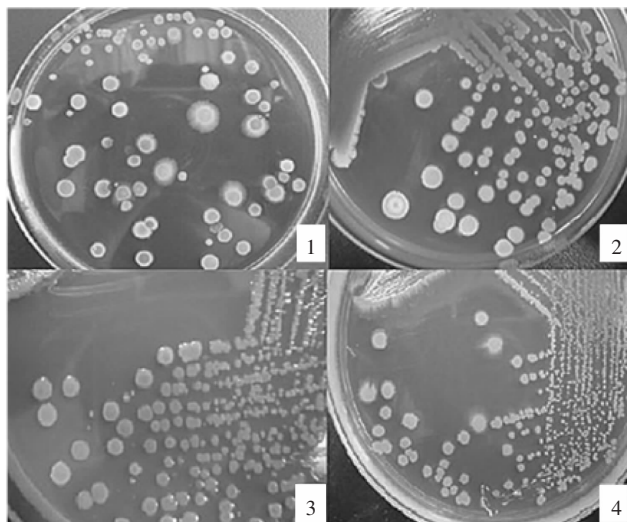
2 结果与分析

2.1 耐盐碱菌株的分离结果

土壤样品混合经过富集培养,将稀释后的土壤悬液涂布在不同盐浓度和 pH 的培养基上。根据菌落大小、形态、颜色等特征,挑取分离平板上的单菌落进行四分体划线纯化,最后从采集的样品中分离得到 75 株细菌,部分分离菌株的培养基图片见图 1。菌株在不同含盐量和 pH 土壤中的分布情况见表 2。培养基盐浓度在 10%以上仍能生长的菌株为耐盐菌,随着盐浓度和 pH 的增加,平板菌落数目形态大小明显变小,菌种形态单一。约 90%的细菌呈橘黄色或者白色,小部分呈黄色。从细胞形态学方面看,74 株菌是杆状的,只有一株菌呈球状。从不同培养基的分离效果上看,以添加 5%~10%的 NaCl 和 pH 为 8~8.5 的培养基上分离的菌落最多,菌落形态较为丰富,而 pH>8.5 和盐度为 10%~20%的培养基上菌落形成单位少,且菌落形态单一。

2.2 可培养耐盐碱菌的群落结构分析

对分离出的 75 株菌的 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增,通过测定碱基序列,获得所有菌株的 16S rDNA 序列信息,最终从 75 株分离的菌株中挑选潜在新种和分离率相对较高的 28 个进行系统发育的多样性分析,这些菌株在 Genbank 的接受号是 JX492591~JX492617,它们的群落结构及同源性分析见表 3。结果表明,这些分离菌株分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、海洋芽孢



1 为 Horikoshi I 富集培养基,2、3、4 为 Horkoshi II 分离纯化培养基,菌株编号分别为 TJTB65、TJTB70、TJTB32

图 1 细菌培养和划线平板图片

Figure 1 Image of cultured bacteria on agar plate

表 2 不同盐度培养基上菌株种类分布情况

Table 2 Distribution of strain under different conditions of medium

pH	0%	3%	5%	7%	10%	12%	15%
7.0	3	4	4	5	3	2	1
7.5	3	4	4	6	4	3	2
8.0	2	4	5	8	6	2	2
8.5	3	3	4	7	5	4	2
9.0	2	4	4	4	3	2	1
9.5	1	3	4	3	3	3	1

杆菌属(*Oceanobacillus*)、鱼露芽孢杆菌属(*Jeotgalibacillus*)和微球菌属(*Micrococcus*)。其中,芽孢杆菌属和海洋芽孢杆菌属是团泊湖可培养耐盐碱菌的优势细菌种群,它们分别占已测种群的 48%(36 株)和 24%(18 株),其他分离菌群分别为鱼露芽孢杆菌属(11 株)、微小杆菌属(9 株)、微球菌属(1 株)。

2.3 可培养细菌的系统进化分析

所有分离菌株的完整 16S rDNA 基因经 Blast 分析及比对后,选取潜在新种和分离率相对较高的 28 株菌构建系统发育树,见图 2。结果表明:75 株菌分别属于细菌域的 *Bacillus*、*Oceanobacillus*、*Jeotgalibacillus*、*Exiguobacterium* 和 *Micrococcus* 属。TJTB04、TJTB11、TJTB35、TJTB60、TJTB65、TJTB70 与典型菌株 *Bacillus pseudofirmus* DSM 8715^T、*Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *oncorhynchi* R-2^T、*Jeotgalibacillus campisalis* S-57^T、*Exiguobacterium profundum* 10C^T、*Oceanobacillus iheyensis* HTE831^T、*Micrococcus yunnanensis* YIM 65004^T

表 3 分离细菌与其关系最密切的典型菌株间系统发育关系

Table 3 Phylogenetic similarity between the isolated bacteria and their closest type strains

种属 Genus	分离菌株编号 No. of isolates	典型菌株(登录号) Closest type strain(accession number)	来源 Origin	相似性/% Similarity/%
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	TJTB01	<i>Bacillus pseudofirmus</i> DSM8715 ^T (X76439)	Alkaliphilic bacilli	99.52
	TJTB04	<i>Bacillus marmarensis</i> GMBE 72 ^T (EU621902)	Mushroom compost	100
	TJTB06	<i>Bacillus zhanjiangensis</i> JSM 099021 ^T (HM460884)	Oyster	95.24
	TJTB09	<i>Bacillus zhanjiangensis</i> JSM 099021 ^T (HM460884)	Oyster	97.27
	TJTB21	<i>Bacillus wakoensis</i> N-1 ^T (AB043851)	Deep-sea	99.27
	TJTB32	<i>Bacillus alcalophilus</i> DSM 485 ^T (X60603)	Food	95.38
	TJTB38	<i>Bacillus akibai</i> 1139 ^T (AB043858)	Deep-sea	99.82
	TJTB59	<i>Bacillus pseudofirmus</i> DSM 8715 ^T (X76439)	Soil	97.83
	TJTB62	<i>Bacillus okhensis</i> Kh10-101 ^T (DQ026060)	Salt lake	99.81
海洋芽孢杆菌属 <i>Oceanobacillus</i>	TJTB11	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i> subsp. oncorhynchi R-2 ^T (AB188089)	The skin of a rainbow trout	100
	TJTB16	<i>Oceanobacillus kimchii</i> X50 ^T (GU784860)	Fermented food	98.62
	TJTB45	<i>Oceanobacillus kimchii</i> X50 ^T (GU784860)	Fermented food	99.62
	TJTB50	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i> subsp. incaldanensis 20AG ^T (AJ640134)	Algal mat	94.80
	TJTB54	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831 ^T (BA000028)	Deep-sea	99.80
	TJTB57	<i>Oceanobacillus sojæ</i> Y27 ^T (AB473561)	Soy sauce	97.34
	TJTB63	<i>Oceanobacillus kimchii</i> X50 ^T (GU784860)	Fermented food	99.62
	TJTB65	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831 ^T (BA000028)	Deep sea	100
鱼露芽孢杆菌属 <i>Jeotgalibacillus</i>	TJTB29	<i>Jeotgalibacillus soli</i> JSM 081008 ^T (FJ527421)	Soil	98.96
	TJTB35	<i>Jeotgalibacillus campisalis</i> SF-57 ^T (AY190535)	Saltern	100
	TJTB51	<i>Jeotgalibacillus salarius</i> ASL-1 ^T (EU874389)	Saltern	94.45
	TJTB52	<i>Jeotgalibacillus salarius</i> ASL-1 ^T (EU874389)	Saltern	97.24
	TJTB55	<i>Jeotgalibacillus soli</i> JSM 081008 ^T (FJ527421)	Soil	98.36
	TJTB64	<i>Jeotgalibacillus alimentarius</i> YKJ-13 ^T (AF281158)	Jeogal	97.18
	TJTB71	<i>Jeotgalibacillus soli</i> JSM 081008 ^T (FJ527421)	Soil	99.91
微小杆菌属 <i>Exiguobacterium</i>	TJTB8	<i>Exiguobacterium marinum</i> TF-80 ^T (AY594266)	Tidal flat	99.91
	TJTB20	<i>Exiguobacterium aestuarii</i> TF-16 ^T (AY594264)	Tidal flat	99.26
	TJTB60	<i>Exiguobacterium profundum</i> 10C ^T (AY818050)	Deep-sea	100
微球菌属 <i>Micrococcus</i>	TJTB70	<i>Micrococcus yunnanensis</i> YIM65004 ^T (FJ214355)	Polyspora axillaris roots	100

的基因相似性为 100%,在系统发育树上与相关典型菌属聚集成簇,说明大部分与其系统关系最密切的典型菌株之间具有较高的遗传相似性(表 3)。而 TJTB8 和 TJTB20 聚成亚簇, TJTB32、TJTB62、TJTB71、TJTB64 分别在单独的分枝上,与其他亚簇聚在一起,分析发现许多可能的潜在新种分散于进化树的多个不同分枝,反应了团泊湖地区可培养耐盐碱菌资源的丰富性和新颖性。但要最终确定这两个菌株的分类地位,还需要综合形态特征、生理生化特征、细胞化学特征、以及与典型菌株基因组间的 DNA-DNA 同源性分析等研究结果。

2.4 可培养耐盐碱菌的多样性分析

从土壤样品中共分离得到 36 株芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株,它们分别属于以下 7 个种:*Bacillus*

Pseudofirmus、*Bacillus marmarensis*、*Bacillus zhanjiangensis*、*Bacillus wakoensis*、*Bacillus alcalophilus*、*Bacillus akibai*、*Bacillus okhensis* 和两个待定的潜在新种 TJTB06 和 TJTB32。其中 15 株(TJTB01、TJTB13、TJTB18、TJTB23、TJTB24、TJTB27、TJTB33、TJTB37、TJTB40、TJTB58、TJTB59、TJTB62、TJTB69、TJTB73、TJTB75)为 *Bacillus Pseudofirmus* 菌株的突变品系,有的分离率最多,它们的 16S rDNA 序列的变异率范围是 0~2.24%;6 株(TJTB04、TJTB07、TJTB11、TJTB19、TJTB25、TJTB34)为 *Bacillus marmarensis* 菌株;5 株(TJTB09、TJTB17、TJTB31、TJTB48、TJTB72)为 *Bacillus zhanjiangensis* 菌株;4 株(TJTB21、TJTB26、TJTB30、TJTB53)为 *Bacillus wakoensi* 菌株;2 株(TJTB28、TJTB36)为 *Bacillus alcalophilus* 菌株;1 株(TJTB38)

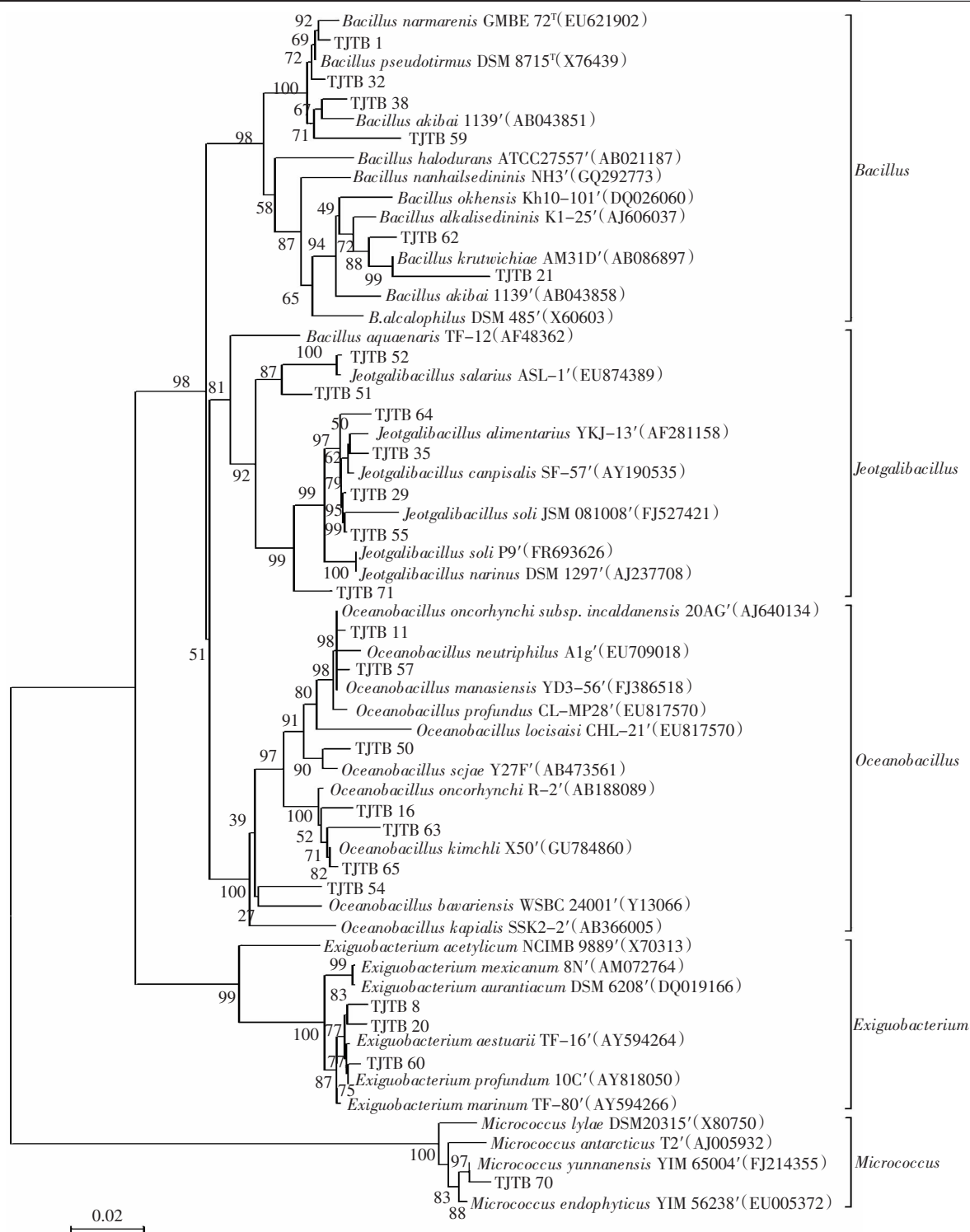


图 2 基于 16S rDNA 基因序列构建天津团泊湖地区土壤样品中耐盐碱菌群落的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree constructed by using the neighbor-joining method based on the 16S rDNA gene sequences of microbial community in saline-alkaline soil in the Tuanbo Lake Area of Tianjin

为 *Bacillus akibai* 菌株; 1 株 (TJTB62) 为 *Bacillus okhensis* 菌株。菌株 TJTB06 和 TJTB32 在 Genbank 上与最相似的菌株 *Bacillus marmarensis*、*Bacillus alcalophilus* 的相似度分别为 95.24%、95.38%, Embley

和 Stackebrandt^[29-30]认为 16S rDNA 基因序列相似性小于 97% 的菌株是属于不同的物种, 据此将它们归为潜在的新种。

试验土壤分离到 18 株海洋芽孢杆菌属

(*Oceanobacillus*)的菌株,它们分别属于以下5个种:*Oceanobacillus oncorhynchi*、*Oceanobacillus kimchii*、*Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis*、*Oceanobacillus iheyensis*、*Oceanobacillus sojae*和1个潜在的新种TJTB50,它在Genbank上与*Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis* 20AG^T (AJ640134)的相似度是94.80%。其中,*Oceanobacillus kimchii*的分离率较多,共有8株(TJTB10、TJTB16、TJTB41、TJTB42、TJTB45、TJTB56、TJTB63、TJTB66),它们的16S rDNA序列的变异率范围是0~1.852%;2株(TJTB11、TJTB12)为*Oceanobacillus oncorhynchi*菌株;3株(TJTB14、TJTB50、TJTB67)为*Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis*菌株;4株(TJTB2、TJTB5、TJTB54、TJTB65)为*Oceanobacillus iheyensis*菌株;1株(TJTB57)为*Oceanobacillus sojae*菌株。

试验土壤中分离到11株*Jeotgalibacillus*菌株,分别属于以下4个种:*Jeotgalibacillus soli*、*Jeotgalibacillus campisalis*、*Jeotgalibacillus salarius*、*Jeotgalibacillus alimentarius*和一个潜在的新种TJTB51,TJTB51与*Jeotgalibacillus soli*(FJ527421)的相似度是95.455%,即为潜在的新种。其中,6株(TJTB03、TJTB29、TJTB55、TJTB61、TJTB68、TJTB71)为*Jeotgalibacillus soli*菌株;2株(TJTB35、TJTB44)为*Jeotgalibacillus campisalis*菌株;2株(TJTB51、TJTB52)为*Jeotgalibacillus salarius*菌株;1株(TJTB64)为*Jeotgalibacillus alimentarius*菌株。试验土壤中分离到9株*Exiguobacterium*菌株,其中4株(TJTB8、TJTB14、TJTB15、TJTB46)为*Exiguobacterium marinum*菌株;3株(TJTB20、TJTB22、TJTB43)为*Exiguobacterium profundum*菌株;2株(TJTB49、TJTB60)为*Exiguobacterium maestuarii*菌株。微球菌属(*Micrococcus*)只有一株TJTB70。以上每个菌属的细菌数量不多,但整体上充分体现了天津团泊湖地区可培养耐盐碱细菌的多样性和群落结构的特征,出现的新种频率也较高。

3 讨论

耐盐碱菌是盐生生态系统重要的组成之一,在盐生环境地球物理循环中起着关键的作用。虽然分子生态学的方法在研究和揭示微生物多样性中得到了极大的拓展,但是要了解微生物在生物圈行使的生态功能,仍需要对它们进行分离纯化,因此分离培养的工作仍然是研究微生物多样性的一个不可缺少的手段。本文采用纯培养法和基于16S rDNA基因序列的系统

进化分析对天津团泊湖地区土壤样品中可培养耐盐碱细菌的多样性进行了研究,应用Hori-hoshi II作为基础培养基从天津滨海盐碱地中分离得到75株耐盐碱菌株,经初步鉴定属于*Bacillus*、*Oceanobacillus*、*Jeotgalibacillus*、*Exiguobacterium*和*Micrococcus*属不同的类群,其结果初步揭示了盐碱地中可培养的耐盐碱菌的多样性及其系统发育。PCR扩增的16S rDNA基因部分序列,片段为1 kb位置到27~1541之间。在这个范围内,细菌的16S rDNA有8个可变区和7个保守区,即使测序结果只有700 bp,在这个范围内仍有6个可变区和5个保守区^[31]。因此,本实验测序区间还是具有较高的保守性,可以比较准确地说明耐盐碱细菌在系统进化树上的进化关系。

本实验不同条件下培养基分离菌株种类数目在pH8~8.5、盐度在7%~10%的范围内最多,在土壤基本理化性质进行检测结果中表明土壤pH均值为8.43呈弱碱性,与上述菌株的筛选结果是一致的。团泊湖地区土壤有机质含量较低为1.05%,全氮含量处于急缺状态为0.059%,具有滨海盐碱地的典型特征,研究结果显示含有10%NaCl的培养基菌落类型数最高,当盐浓度超过10%后,其出菌率下降。盐是限制作物生长和生产力的重要非生物因子,离子不平衡和高浓度的盐胁迫条件会引起植物高渗透导致植物氧化胁迫条件,此时,有益微生物,特别是能促进植物生长的细菌和菌根,对植物在盐碱地中的生长起到很大帮助^[32]。孙佳杰等^[33]的研究表明天津滨海土壤盐碱程度呈斑块土壤中分离的嗜盐细菌状分布,土壤微生物总量少,细菌主要以芽孢杆菌为主,这与本文的研究结果是也一致的。

16S rRNA的系统发育是研究环境微生物相互关系的有效工具,然而,尽管大量的数据表明16S rRNA是研究细菌进化和亲缘关系的重要指标,但由于16S rRNA序列在原核生物中的高度保守性,对于相近种或同一种内的不同菌株之间的鉴别分辨力较差,因此其可靠性不充分^[34]。从系统树上可以看到,TJTB21、TJTB52、TJTB55、TJTB57和TJTB11分别聚集在*Bacillus krulwichiae*、*Jeotgalibacillus salarius*、*Jeotgalibacillus soli*、*Oceanobacillus neutrophilus*和*Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis*簇中,具有99%或100%的高似性,但要具体到种或同种内不同菌株还要考察菌落形态、革兰氏染色、产酸、明胶水解和淀粉水解等表型特征方面与参考菌株的关系,Ripka等研究表明来自不同生境的微生物为了适应其生存环境在一些

基本的生理过程中已经进化出了某些适宜于环境的生理变化^[35]。吴海平等在新疆达坂盐湖沉积土壤中分离的嗜盐细菌与本文分离出的优势菌群都是芽孢杆菌属(*Bacillus*);冯玮等在四川大公古盐井中分离出的可培养细菌中优势菌群 *Oceanbacillus* 是本文研究的次优势菌群。由此可见,本文研究结果与内陆高盐地区高盐环境中的种属具有一定的相关性。

目前,可分离培养的微生物仅占环境微生物的1%~10%,大量的微生物不能培养或现阶段难于培养,在这些未知种群中,蕴藏着目前还无法估量的资源。因此,进一步研究耐盐碱微生物,加强对这类特殊生境中微生物的认识,将有利于丰富我国耐盐碱菌的生物多样性,为我们利用这些特殊的微生物资源奠定基础。

4 结论

(1)天津团泊湖地区盐渍土中可培养耐盐碱细菌在 pH8~8.5、盐度在 7%~10%的范围内分离的菌株类型最多。

(2)天津团泊湖地区轻中度盐渍化土壤经富集培养后共得到 75 株隶属 5 个属的细菌,其中 *Bacillus* 和 *Oceanbacillus* 为优势种,还有 4 株潜在新种。

(3)天津团泊湖地区可培养耐盐碱细菌资源较为丰富,具有解决沿海地区盐碱化程度高、土壤有机质含量低等问题的潜力,为我们提供了一个低成本高效率的土地资源开发和生态环境保护基础。

参考文献:

- [1] Dodia M S, Rawal C M, Bhimani H G, et al. Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated *Haloalkaliphilic bacterium* sp. AH-6[J]. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2008, 35(2): 121-131.
- [2] 吴海平,王真辉,杨礼富.新疆达坂盐湖沉积土壤嗜盐细菌的定向富集与多样性分析[J].微生物学通报,2010,37(7):956-961.
WU Hai-ping, WANG Zhen-hui, YANG Li-fu. The selective enrichment and diversity analysis of *Halophilic bacteria* in sedimental sample from Daban Salt Lake in Xinjiang[J]. *Microbiology*, 2010, 37(7):956-961.
- [3] Tindall B J, Ross H N M, Grant W D. *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., to new genera of haloalkaliphilic archae bacteria[J]. *Syst Appl Microbiol*, 1984, 5:41-57.
- [4] David R, Arahal M, Marquez C, et al. *Bacillus marismortui* sp. nov., a new moderately halophilic species from the Dead Sea[J]. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 1999, 49:521-530.
- [5] Doronina N, Darmaeva T, Trotsenko Y. *Methylophaga natronica* sp. nov., a new alkaliphilic and moderately halophilic, restricted-facultatively methylophilic bacterium from soda lake of the Southern Transbaikalian region[J]. *Systematic Applied Microbiology*, 2003, 26(3):382-389.
- [6] Foti M, Ma S, Sorokin D Y, et al. Genetic diversity and biogeography of haloalkaliphilic sulphur-oxidizing bacteria belonging to the genus *Thioalkalivibrio*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 56(1):95-101.
- [7] Hoover R B, Pikuta E V, Bej A K, et al. *Spirochaeta americana* sp. nov., a new haloalkaliphilic, obligately anaerobic spirochaete isolated from soda Mono Lake in California[J]. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(3):815-821.
- [8] Nowlan B, Dodia M S, Singh S P, et al. *Bacillus okhensis* sp. nov., a halotolerant and alkalitolerant bacterium from an Indian saltpan [J]. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(5):1073-1077.
- [9] Sorokin D Y, Kuenen J G. Chemolithotrophic haloalkaliphiles from soda lakes[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52(3):287-295.
- [10] Dimitry Y, Kuenen J G. *Haloalkaliphilic* sulfur-oxidizing bacteria in soda lakes[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2005, 29(4):685-702.
- [11] Tikhonova T V, Slutsky A, Antipov A N, et al. Molecular and catalytic properties of a novel cytochrome c nitrite reductase from nitrate-reducing haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio nitratireducens*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1764(4):715-723.
- [12] 武庆树,郭云峰,窦连彬,等.天津市盐碱地改良思路[J].农业环境与发展,2004,21(2):32-33.
WU Qing-shu, GUO Yun-feng, DOU Lian-bin, et al. Development idea in Tianjin saline and alkaline land[J]. *Agro-Environment and Development*, 2004, 21(2):32-33.
- [13] Zhang X, Takano T, Liu S. Identification of a mitochondrial ATP synthase small subunit gene(RMtATP6) expressed in response to salt and osmotic stresses in rice(*Oryza sativa* L.)[J]. *Journal of Environmental Botany*, 2005, 57(1):193-200.
- [14] Ren Peigen, Zhou Peijin. Research progress of moderately *Halophilic Eubacteria*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2003, 43(3):427-431.
- [15] Zhou Y, Chen M L, Jiang L, et al. Application of 16S rRNA sequence analysis for the study of atmospheric bacteria[J]. *Letters in Biotechnology*, 2000, 11(2):111-114.
- [16] 洪义国,孙 谧,李勃生.16S rRNA 在海洋微生物系统分子分类鉴定及分子检测中的应用[J].海洋水产研究,2002,23(1):58-63.
HONG Yi-guo, SUN Mi, LI Bo-sheng. The application of 16S rRNA in molecular classification, identification and molecular examination in marine microbial system[J]. *Marine Fisheries Research*, 2002, 23(1):58-63.
- [17] Zhang R, Li Y. Application of 16S rRNA in the detection of bacteria in mouth[J]. *Foreign Medical Sciences*, 2000, 27(6):354-356.
- [18] Guan T W, Zhao K, Xia Z F, et al. Actinobacterial community structure of a soil sample from Yutian Pit in Xinjiang Revealed by culture-independent method[J]. *Microbiology*, 2009, 36(4):515-521.
- [19] Jiang H C, Dong H L, Zhan G X, et al. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in Northwestern China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6):3832-3845.

- [20] Guan T W, Wu J Y, Zhi X Y, et al. Actinobacterial diversity of a sediment sample from Xiaokule Lake[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(7):851-856.
- [21] Koki Horikoshi. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology[J]. *Microbiological Reviews*, 1999, 63(4):735-750.
- [22] Mako K, Eiichi M, Hisashi K, et al. 16S Ribosomal DNA-Based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Applied Microbiology*, 2002, 68(2):699-704.
- [23] David R Boone, David H Bergey, Richard W, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol1[M]. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 2001:294-334.
- [24] Rantwd G, Larsen H. Bergey's manual of systematic bacteriology[M]. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1989, 3:2216-2233.
- [25] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24):4876-4882.
- [26] 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.
- [27] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2):111-120.
- [28] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39:783-791.
- [29] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. *International Journal of Systematic and Bacteriology*, 1994, 44(4):846-849.
- [30] 徐丽华, 李文均, 张玉琴, 等. 关于细菌新分类单元描述的标准化[J]. 微生物学通报, 2004, 31(6):126-127.
- XU Li-hua, LI Wen-jun, ZHANG Yu-qin, et al. Describing standardization of bacteria new classification unit[J]. *Microbiology*, 2004, 31(6):126-127.
- [31] 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.
- ZHANG Xian-hui, KONG Fan-jing. Bacterial diversity in Zabuye Salt Lake of Tibet by culture-independent approaches[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(3):334-341.
- [32] 李凤霞, 郭永忠, 许兴. 盐碱地土壤微生物生态特征研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(23):14065-14067.
- LI Feng-xia, GUO Yong-zhong, XU Xing. Research progress of the microbial characteristics of saline-alkali soil[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(23):14065-14067.
- [33] 孙佳杰, 尹建道, 解玉红, 等. 天津滨海盐碱土壤微生物生态特性研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2010, 34(3):57-61.
- SUN Jia-jie, YIN Jian-dao, XIE Yu-hong, et al. Microbial ecological characteristics of saline-alkali soil in coastal area of Tianjin[J]. *Journal of Nanjing Forestry University(Natural Science Edition)*, 2010, 34(3):57-61.
- [34] Ripka K, Denner E B M, Michaelsen A, et al. Molecular characterization of Halobacillus strains isolated from different medieval wall paintings and building materials in Austria[J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2006, 58(3-4):124-132.
- [35] Ruiz A, Poblet A, Mas J M, et al. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, 50(6):1981-1987.