

殷婷婷, 薛梦颖, 丁丽燕, 等. 嗜盐细菌 XJ12 的分子鉴定与生长特性研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 368–370.

嗜盐细菌 XJ12 的分子鉴定与生长特性研究

殷婷婷, 薛梦颖, 丁丽燕, 王 宇, 齐 捷, 杨 丽, 温洪宇

(江苏师范大学生命科学学院, 江苏徐州 221116)

摘要:从连云港盐田卤水中分离到 1 株嗜盐细菌菌株, 编号为 XJ12, 该菌株细胞形态为杆状, 革兰氏染色呈阳性; 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物对 XJ12 进行 PCR 扩增, 扩增出长约 1.5 kb 的目的片段, 经过克隆后测序, 得到 1 530 bp 的核苷酸序列, GenBank 登录号为 JX992844; 利用 Clustalx 1.8 软件和 MEGA 4.0 软件对其及相近物种进行同源性比较和系统发育学分析, 表明它属于嗜盐芽孢杆菌属 (*Halobacillus*); 通过进行不同 pH 值和 NaCl 浓度对 XJ12 生长的影响试验研究, 结果表明, pH 值为 7.0~8.0、NaCl 浓度为 2.0 mol/L 时, XJ12 生长情况最佳; 通过绘制一步生长曲线, 表明 XJ12 在 37 ℃ 培养条件下, 0~6 h 是延滞期, 6~12 h 为对数生长期, 12 h 后进入稳定期。

关键词:嗜盐细菌; 16S rRNA 基因; PCR; 克隆; 系统发育

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)11-0368-03

嗜盐微生物是一类生长在高盐环境中的微生物。我国拥有丰富的海洋资源, 其中生长着大量的嗜盐微生物。国内已对新疆、西藏、内蒙古等地盐湖中嗜盐微生物物种进行了大量研究^[1-2], 表明盐湖中生长着大量的嗜盐细菌与嗜盐古菌。嗜盐细菌作为中度嗜盐菌, 分布广泛, 除存在于极端高盐环境外, 还存在于海洋环境中^[3-5], 耐受盐浓度范围为 3%~15%^[6], 主要是通过细胞内产生并积累相溶性溶质来平衡外界的高盐环境^[7-11]。近年来, 国内已对中度嗜盐菌的生理特性、遗传多样性和耐盐相关基因克隆等方面进行了相关研究^[12-16]。

前人对我国高盐环境如盐池、盐湖与盐田的微生物类群进行了大量的研究^[17-19]。连云港盐田作为我国东部沿海的主要产盐区, 蕴藏着丰富的嗜盐微生物资源。针对目前对该盐田嗜盐细菌物种研究较少的现状, 通过采集连云港盐田卤水, 经分离纯化后获得 1 株嗜盐细菌 XJ12, 对其 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增, 克隆后测序, 得到的序列与相似性序列构建分子发育树后进行同源性比较和系统发育学分析, 并对其生长特性进行研究, 这对于完善我国高盐环境中嗜盐细菌的物种资源具有重要意义, 有助于对嗜盐细菌的进一步开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 卤水经过逐级梯度稀释后, 涂布与划线分离获得。

1.1.2 培养基 嗜盐菌培养基: 酵母膏 (Oxoid) 10 g、蛋白胨 7.5 g、柠檬酸三钠 3 g、NaCl 200 g、KCl 2 g、MgSO₄·7H₂O 10 g、水 1 000 mL、琼脂粉 20 g (固体培养基), pH 值 7.0。培

养基配制后在 121.5 ℃ 灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌落形态观察 将分离纯化出的嗜盐细菌菌株接种于嗜盐菌培养基平板上, 置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后进行菌落形态观察, 菌体形态通过扫描电镜观察。

1.2.2 总 DNA 的提取 采用上海生工细菌基因组 DNA 抽提试剂盒进行抽提。

1.2.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增 50 μL 反应体系: ddH₂O 20 μL、PF27 正向引物 (5 μmol/L) 2 μL、PR1492 反向引物 (5 μmol/L) 2 μL、基因组 DNA 1 μL、2×Taq Mix 25 μL。所用引物为细菌通用引物: 正向引物 F27: 5′-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3′; 反向引物 R1492: 5′-CTACGGTTACCTTGTTACGAC-3′^[20]。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; 最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物 4 ℃ 保存。

1.2.4 PCR 扩增产物胶回收 采用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒从琼脂糖凝胶中回收目的 DNA 片段, -20 ℃ 保存备用。

1.2.5 与 pMD18-T Vector 连接和转化 按照宝生物工程 (大连) 有限公司 PCR 产物克隆用载体 pMD18-T Vector 试剂盒说明操作, 连接 16S rRNA 目的基因后转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 感受态细胞, 蓝白斑筛选后挑取白色菌落摇菌后 PCR 检测。

1.2.6 测序 培养物由南京斯普金生物科技有限公司进行测序。

1.2.7 系统发育树的构建 采用 Clustalx 1.8 软件, 将菌株 XJ12 的 16S rDNA 序列与从 GenBank 数据库中 BLAST 获得的相似性较高序列进行多序列比对, 采用软件 MEGA4.0 Neighbor-Joining 法进行聚类分析和构建系统进化树^[21], 重复取样 1 000 次^[22]。

1.2.8 嗜盐细菌的生长特性

1.2.8.1 不同 NaCl 浓度对嗜盐细菌生长的影响 在培养基中加入 NaCl, 使其终浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0 mol/L, 每个浓度梯度设置 3 个平行,

收稿日期: 2013-04-03

作者简介: 殷婷婷 (1992—), 女, 山西忻州人, 本科生, 从事环境微生物学方向的研究。E-mail: ytt810154622@163.com。

通信作者: 温洪宇, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境微生物学。E-mail: wenhy2007@126.com。

灭菌后接种嗜盐细菌,培养温度为 37 ℃,摇床转速为 200 r/min,12 h 后以不接种嗜盐细菌的空白培养基为对照,测其 $D_{600\text{ nm}}$ 值,下同。

1.2.8.2 不同 pH 值对嗜盐细菌生长的影响 在 pH 值分别为 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10 的培养基中接种嗜盐细菌,每个梯度设置 3 个平行,37 ℃、200 r/min 转速的摇床中培养,12 h 后,以空白培养基为对照,测定其 $D_{600\text{ nm}}$ 值。

1.2.8.3 嗜盐细菌一步生长曲线 在培养温度为 37 ℃、摇床转速为 200 r/min 的培养条件下,对嗜盐细菌进行培养,以空白培养基为对照,每隔 2 h 检测菌体溶液 $D_{600\text{ nm}}$ 值,设置 3 个平行试验,根据记录结果绘制嗜盐细菌一步生长曲线。

2 结果与分析

2.1 嗜盐细菌菌落形态与细胞形态

从连云港盐田卤水中分离纯化出 1 株嗜盐细菌,编号为 XJ12,该菌在嗜盐菌培养基平板上生长良好,菌落呈乳白色,表面黏稠,隆起,不透明,边缘整齐;菌体细胞形态为杆状,具体见图 1。



图1 菌株XJ12的细胞形态

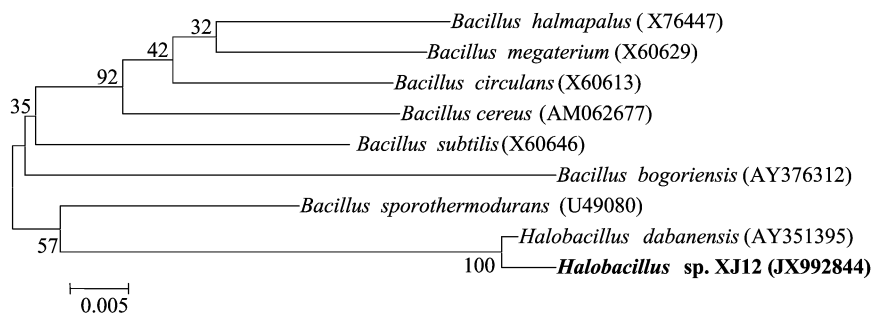


图4 基于16S rDNA序列的菌株XJ12与邻近嗜盐菌株构建的分子发育树

2.4 嗜盐细菌 XJ12 在不同 NaCl 浓度中的生长特性

由图 5 可以看出,嗜盐细菌 XJ12 具有很强的耐盐能力,可在 NaCl 浓度为 0 ~ 5.5 mol/L 的培养基中生长,其最适生长 NaCl 浓度为 2.0 mol/L;当 NaCl 浓度高于 4.5 mol/L 后,其生长量下降很快,当盐浓度由 4.5 mol/L 升高到 5.5 mol/L 时,其 $D_{600\text{ nm}}$ 值由 0.208 下降到了 0.001。

2.5 嗜盐细菌 XJ12 在不同 pH 条件下的生长特性

由图 6 可见,嗜盐细菌 XJ12 能在 pH 值为 5.0 ~ 10.0 的嗜盐培养基中生长,其最适生长 pH 值为 7.0。pH 值高于 9.0 时生长受到明显抑制,当 pH 值由 9.0 降到 10.0 时,其 $D_{600\text{ nm}}$ 也由 0.52 降为 0.25。

2.2 嗜盐细菌 XJ12 16S rDNA 序列 PCR 扩增与序列分析

对嗜盐细菌 XJ12 进行 16S rDNA 序列 PCR 扩增后,经过克隆蓝白斑筛选后测序,测序结果见图 2 和图 3,其中图 2 为正向引物序列图谱,图 3 为反向引物序列图谱。由图谱可以看出,测序结果无套峰和杂峰,试验结果具有可信性。最终得到长度为 1 530 bp 的有效序列,已提交至 GenBank,登录号为 JX992844。

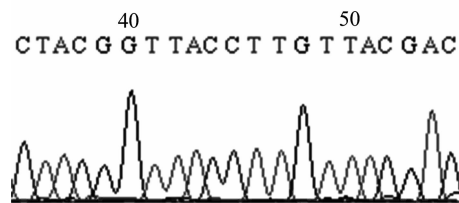


图2 正向引物序列测序结果

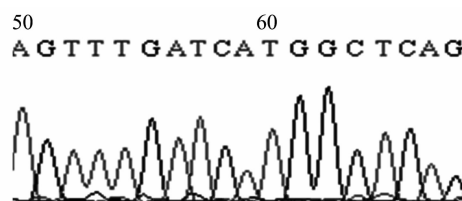


图3 反向引物序列测序结果

2.3 嗜盐细菌 XJ12 与相近物种的系统发育学分析

基于 16S rRNA 基因序列,对菌株 XJ12 与亲缘关系近的模式菌株进行分子发育学分析。由图 4 可见,菌株 XJ12 与嗜盐芽孢杆菌属中的 *Halobacillus dabanensis* (登录号为 AY351395) 聚为一支,置信度为 100%,序列相似性为 99.3%,初步确定菌株 XJ12 属于嗜盐芽孢杆菌属,并命名为 *Halobacillus* sp. XJ12。

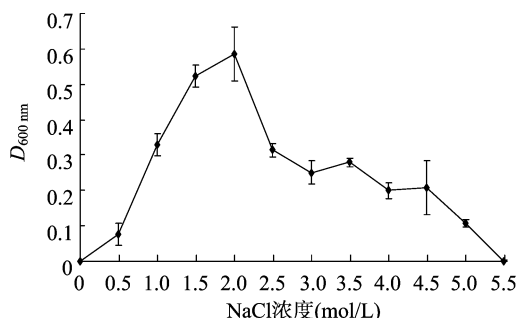


图5 不同NaCl浓度对菌株XJ12生长的影响

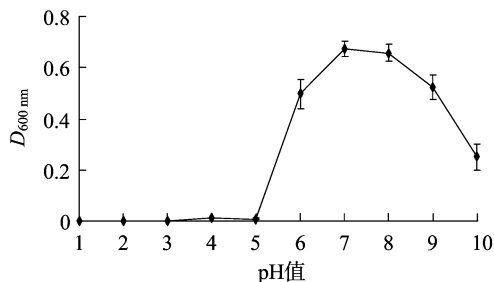


图6 不同pH值对菌株XJ12生长的影响

2.6 嗜盐细菌 XJ12 的一步生长曲线

由图 7 可见,嗜盐细菌 XJ12 在 0~6 h 时处于延滞期,6~12 h 为对数生长期,12 h 时进入稳定期,细胞数达到最大值, $D_{600\text{ nm}}$ 值为 1.187。

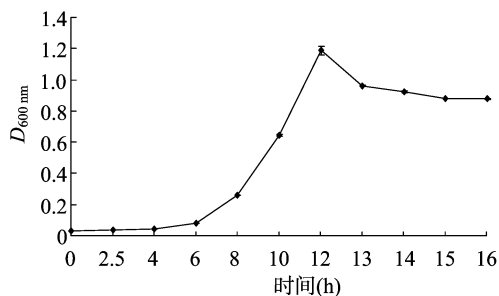


图7 菌株XJ12的一步生长曲线

3 小结与讨论

基于 16S rDNA 序列可对物种之间的同源性进行分析,如果同源性小于 98%,认为属于不同种;同源性小于 93%~95%,认为属于不同属^[23]。从连云港盐田卤水中分离出的嗜盐细菌菌株 XJ12,通过 16S rRNA 基因序列克隆与测序,对其分类学地位进行了系统发育学分析,菌株 XJ12 与嗜盐芽孢杆菌属(*Halobacillus*)聚为一支,且相似性为 99.3%,初步确定属于同一类群。对 XJ12 的生长特性研究表明,XJ12 具有很强的耐盐和适应盐浓度变化的能力,生长的 NaCl 浓度范围为 0~5.5 mol/L,最适生长 NaCl 浓度为 2.0 mol/L;XJ12 生长的 pH 值范围为 5.0~10.0,最适生长 pH 值为 7.0;XJ12 一步生长曲线表明,在 0~6 h 时处于延滞期,6~12 h 为对数生长期,12 h 后进入稳定期。前人研究表明,嗜盐菌生长于高盐浓度环境下,能够保持其细胞正常代谢活动的机制是通过体内积累四氢嘧啶提高细胞内水活度,从而使细胞体积和膨压保持在正常水平^[15]。嗜盐菌株 XJ12 采用何种方式适应高盐环境,还有待后续研究。

参考文献:

- [1] 孙晓玲,王柏玲,刘东波,等. 一株中度嗜盐菌的分离及生物学特性[J]. 应用与环境生物学报,2012,18(3):477-481.
- [2] 李卫,刘艳丽,曹海华,等. 两株中度嗜盐菌的分离与生理生化分析[J]. 兰州大学学报:自然科学版,2003,39(4):58-61.
- [3] 徐德强,黄静娟,张纪忠,等. 盐单胞菌属一新种的鉴定[J]. 复旦学报:自然科学版,1995,34(4):451-458.
- [4] 徐德强,黄静娟,张纪忠,等. 盐单胞菌属一新种——黄海盐单胞

- 菌[J]. 微生物学报,1995,35(5):315-321.
- [5] 陈志亮,傅英楠,姜蔚宇,等. 南极深海底泥中度嗜盐菌盐单胞菌属 Nj223 ectC 基因的克隆表达及 ectoine 合成酶性质分析[J]. 微生物学报,2007,47(2):363-365.
- [6] Kushner D J. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria[M]//Kushner D J. Microbial life in extreme environments. London: Academic Press, 1978: 317-368.
- [7] Goude R, Renaud S, Bonnassie S, et al. Glutamine, glutamate, and alpha-glucosylglycerate are the major osmotic solutes accumulated by *Erwinia chrysanthemi* strain 3937 [J]. Applied and Environment Microbiology, 2004, 70(11): 6535-6541.
- [8] Kapfhammer D, Karatan E, Pflughoeft K J, et al. Role for glycine betaine transport in *Vibrio cholerae* osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities[J]. Applied and Environment Microbiology, 2005, 71(7): 3840-3847.
- [9] Ventosa A, Nieto J J, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(2): 504-544.
- [10] Mukhopadhyay A, He Z L, Alm E J, et al. Salt stress in *Desulfovibrio vulgaris* hildenborough: an integrative genomics approach [J]. J Bacteriol, 2006, 188(11): 4068-4078.
- [11] Vargas C, Jebbar M, Carrasco R, et al. Ectoines as compatible solutes and carbon and energy sources for the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(1): 98-107.
- [12] 何健,汪婷,孙纪全,等. 以四氢嘧啶为主要相容性溶质的中度嗜盐菌 I15 的分离和特性研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(6): 900-904.
- [13] 赵百锁,杨礼富,王磊,等. 中度嗜盐菌相容性溶质机制的研究进展[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 937-941.
- [14] 沈萍. 微生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 338-339.
- [15] 张薇,胡跃高,张力群,等. 中度嗜盐菌 DTY1 的鉴定及其耐盐机制的初步分析[J]. 微生物学报, 2006, 46(6): 956-960.
- [16] 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.
- [17] 李维国,马放,魏利,等. 一株盐单胞菌及其强化高盐制革废水处理的研究[J]. 湖南科技大学学报: 自然科学版, 2007, 22(4): 117-121.
- [18] 侯梅锋,何士龙,李栋,等. 连云港海底底泥及青海湖底泥细菌多样性研究[J]. 环境科学, 2011, 32(9): 2681-2688.
- [19] 曾静,窦岳坦,王磊,等. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌的 16S rDNA 全序列及 DNA 同源性分析[J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 133-137.
- [20] Polz M F, Cavanaugh C M. Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR [J]. Applied and Environment Microbiology, 1998, 64(10): 3724-3730.
- [21] 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.
- [22] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [23] 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.