

一株中度嗜盐菌新种 LYG2# 的分离与鉴定

纪昌伟, 陆宇豪, 杜梦, 王子元 (江苏师范大学生命科学学院, 江苏徐州 221116)

摘要 [目的] 对一株从连云港青口卤水中分离纯化出的细菌 LYG2# 进行分类学鉴定。[方法] 通过 16S rRNA 基因序列比对、系统发育分析和一系列生理生化指标测定对该细菌 LYG2# 进行鉴定。[结果] 该菌为革兰氏阴性菌, 菌落形态为圆形, 粉红色。电镜下观察菌体为螺旋状, 长 1.50~2.00 μm , 宽 0.24 μm 。LYG2# 最适生长盐浓度为 9.6%, 最适生长温度为 32 $^{\circ}\text{C}$, 最适 pH 为 8.5。通过 16S rRNA 基因序列比对, 发现其与 *Spiribacter salinus* M19-40^T 的相似度最高, 为 95.98%。菌株 LYG2# 在中国科学院的保藏号为 CGMCC 1.12136, GenBank 序列登录号为 JQ087462。[结论] 分离的菌株 LYG2# 为一株中度嗜盐菌, 是 *Spiribacter* 属的一个新种资源。

关键词 中度嗜盐菌; 分类学鉴定; 新种; 连云港青口水样

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)09-0005-03

Isolation and Identification of a Moderately Halophilic Bacterium LYG2#

JI Chang-wei, LU Yu-hao, DU Meng et al (School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116)

Abstract [Objective] To identify a strain LYG2# isolated from Lianyungang Qingkou Salinas. [Method] We identified the strain LYG2# by means of 16S rRNA gene sequence blast, phylogenetic analysis and the determination of physiological and biochemical characteristics. [Result] The bacteria was gram negative, appeared pink and round colony. Strain LYG2# was spiral, the length of the bacteria was from 1.50 to 2.00 μm , and the width was 0.24 μm . The optimum salt concentration, temperature and pH were 9.6%, 32 $^{\circ}\text{C}$ and 8.5. By 16S rRNA gene sequence blast, the 16S rDNA of the strain LYG2# and *Spiribacter salinus* M19-40^T showed the highest similarity, was 95.98%. Strain LYG2# was preserved at China General Microbiological Culture Collection Center, the number was CGMCC 1.12136, the GenBank accession number for 16S rDNA of the strain was JQ087461. [Conclusion] The bacteria isolated was a moderately halophilic bacterium, and was a new species of the *Spiribacter* genus.

Key words Moderately halophilic bacterium; Identify; New species; Lianyungang Qingkou Salinas

地球上存在着各种各样的高盐环境, 它们大部分是由海水的蒸发而形成, 钠离子和氯离子是此类环境中的主要离子, 其 pH 接近中性到弱碱性。嗜盐菌是生活在此类高盐环境中的主要微生物, 这类微生物基因型独特, 生理机制和代谢产物也不同于一般细菌, 已经逐渐适应了这种高盐环境^[1-3]。我国有各种各样的高盐环境, 孕育了丰富的嗜盐菌。

嗜盐菌种类繁多, 根据目前受到普遍认可的 Kushner^[4] 的分类系统, 按照嗜盐菌对不同 NaCl 浓度的需求, 大致可分为非嗜盐细菌 (< 0.2 mol/L NaCl)、轻度嗜盐菌 (0.2 ~ < 0.5 mol/L NaCl)、中度嗜盐菌 (0.5 ~ < 2.5 mol/L NaCl)、极端嗜盐菌 (2.5 ~ 5.2 mol/L NaCl) 以及耐盐菌。中度嗜盐菌生长的盐浓度范围相对较宽, 其生长又对盐有着绝对的依赖性, 加之比较容易分离培养等优点, 引起了人们的广泛关注, 关于中度嗜盐菌的相关报道也越来越多。笔者从连云港青口水样中分离纯化出一株嗜盐细菌 LYG2#, 并对其进行了分类学鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌。 菌株 LYG2# 从连云港青口 (119 $^{\circ}$ 12' ~ 119 $^{\circ}$ 15' E, 34 $^{\circ}$ 40' ~ 34 $^{\circ}$ 42' N) 卤水中分离得到。

1.1.2 试剂。 DNA Marker、限制性内切酶等购自 Fermentas 公司; 引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.1.3 主要仪器。 恒温摇床、恒温培养箱、PCR 仪、电泳仪、

凝胶成像系统。

1.1.4 培养基。 10% MGM 培养基 (1 L): 30% 人工海水 333 mL, 蛋白胨 5 g, 酵母膏 1 g。配制固体培养基时加 1.5% 琼脂。其他盐浓度的培养基采用相同方法配制。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与纯化。 用 20% 的人工海水, 按照 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 梯度稀释样品, 吸取 0.1 mL 稀释液涂 10% MGM 平板, 在恒温培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养。总培养时间为 30 d 左右, 在此期间注意观察, 根据形态、颜色、大小对平板上生长的单菌落进行筛选。为了确保菌种的纯度, 每个单菌落划线 3 次, 纯化后的细菌分别保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 和室温。将斜面保存的细菌寄存到中国科学院微生物保存中心进行保藏。

1.2.2 形态学鉴定。 将菌株 LYG2# 在 10% MGM 固体培养基上划线培养, 获得单菌落, 观察其菌落形态, 并进行革兰氏染色和扫描电镜观察。

1.2.3 生理生化指标的鉴定。 生化和酶学鉴定参考东秀珠等^[5] 的《常见细菌系统鉴定手册》, 测定菌株的各种特征。抗生素敏感试验参照美国国家临床实验室标准委员会推荐的 K-B 法 (纸片扩散法)^[6]。

1.2.4 化学指标的测定。 菌株基因组 G+C 含量的测定采用热变学法^[7], 用 Thermo scientific Evolution 300 测定 Tm 值, 细菌 DNA (G+C) mol% = (Tm - 69.3) \times 2.44。脂肪酸、呼吸醌测定由德国 DSMZ 公司完成。

1.2.5 菌株最适生长环境的测定。

1.2.5.1 最适生长盐浓度。 将菌株 LYG2# 等量的菌液分别接种于盐浓度为 5.6%、6.4%、8.0%、9.6%、11.2%、12.8%、14.4%、16.0%、17.6%、19.2% 的 MGM 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养。

基金项目 国家自然科学基金委项目 (30571071)。

作者简介 纪昌伟 (1992—), 男, 江苏淮安人, 硕士研究生, 研究方向: 极端环境微生物。

收稿日期 2017-01-16

1.2.5.2 最适生长温度。将菌株 LYG2#等量的菌液接种于最适盐浓度的 MGM 液体培养基中,分别于 22、28、32、37、42、46、50 °C 条件下摇床培养。

1.2.5.3 最适生长 pH。将菌株 LYG2#等量的菌液接种于最适盐浓度,pH 为 6.5、6.8、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 的 MGM 液体培养基中,于最适温度下摇床培养。

1.2.6 菌株 16S rRNA 基因序列分析以及系统进化树构建。依据总基因组提取方法获得基因组 DNA,利用通用引物对 (B27F: AGAGTTTGATCATGGCTCAG, B1492R: CTACGGTTA CCTTGTTACGAC)对菌株 16S rRNA 基因进行扩增。PCR 扩增体系:10 × PCR 缓冲液 5.0 μL, B27F (10 μmol/L) 2.0 μL, B1492R (10 μmol/L) 2.0 μL, dNTPs (5 mmol/L) 2.0 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 5.0 μL, Taq DNA 聚合酶 (5.0 U/μL) 0.5 μL, DNA 模板 2.0 μL, 加水至 50.0 μL。PCR 扩增程序:95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 53 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物经 TA 克隆,送上海生工生物技术有限公司进行测序,测序引物是通用引物 T7 和 SP6。将测序得到的菌株 16S rDNA 序列到 GenBank 和 EzTaxon server 2.1 数据库上进行同源性搜索,获得序列同源性高的相关菌株的 16S rDNA 序列。用 CLUSAL X 1.83 软件包进行序列比对。通过 MEGA version 4.1 软件,使用 Neighbour-joining 法^[8]构建系统发育树。通过 1 000 次独立取样确定其 Bootstrap 值。

2 结果与分析

2.1 菌株的采集与分离 细菌分离自连云港青口卤水样中,命名为 LYG2#。该菌株已保存于 CGMCC,保藏号为 CG-MCC1.12136。

2.2 菌株的形态学特征 菌株 LYG2#接种于 10% MGM 平板,生长 6 d 后的菌落形态为圆形,粉红色小菌落,菌落凸起,表面光滑,边缘整齐。革兰氏染色为阴性,电镜下观察菌体为螺旋状,长 1.50~2.00 μm,宽约 0.25 μm (图 1)。

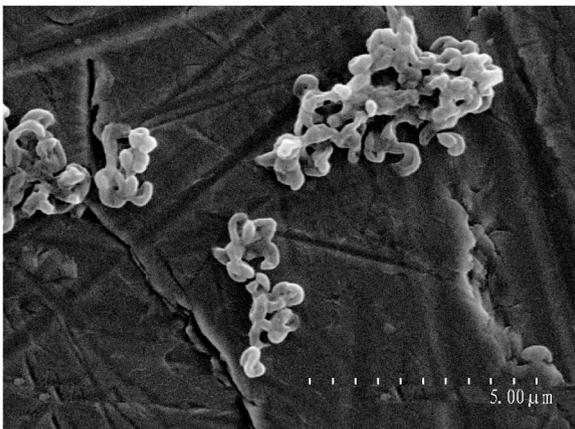


图 1 菌株 LYG2#的扫描电镜结果

Fig. 1 Scanning electron microscopy results of the strain LYG2#

2.3 菌株的生理生化特性 菌株 LYG2#氧化酶和接触酶反应呈阳性;MR 和 VP 反应呈阴性;硝酸还原的生化反应呈阴性。此外,该菌株不产生吡啶和 H₂S;表 1 列出了菌株 LYG2#具体的碳源利用和糖醇产酸反应的结果;表 2 列出了菌株

LYG2#抗生素敏感性试验的结果。

表 1 菌株 LYG2#对不同碳源的利用和糖醇产酸试验结果

Table 1 The results for carbon source utilization and sugar alcohol produce acid of the strain LYG2#

底物 Substrate	碳源利用 Carbon source utilization	糖醇产酸 Sugar alcohol produce acid
可溶性淀粉 Soluble starch	-	-
D-木糖 D-xylose	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-
果糖 Fructose	+	-
麦芽糖 Maltose	+	-
D-半乳糖 D-galactose	-	-
D-葡萄糖 D-glucose	++	+
山梨醇 Sorbitol	++	-
甘露醇 Mannitol	-	-
L-阿拉伯糖 L-arabinose	++	+

表 2 菌株 LYG2#的抗生素敏感性试验结果

Table 2 Antibiotic sensitivity of the strain LYG2#

抗生素 Antibiotics	LYG2# 耐药性结果 Drug resistance results of strain LYG2#	抗生素 Antibiotics	LYG2# 耐药性结果 Drug resistance results of strain LYG2#
青霉素 Penicillin	-	红霉素 Erythromycin	-
氨苄青霉素 Ampicillin	-	氟哌酸(若氟沙星) Norfloxacin	-
先锋霉素 V Cephalothin V	-	丙氟哌酸(环丙沙星) Ciprofloxacin	-
丁胺卡那霉素 Amikacin	-	复方新诺明 Compound Sinomin	-
庆大霉素 Gentamicin	-	四环素 Tetracycline	-
氯霉素 Chloramphenicol	-	链霉素 Streptomycin	-

注:“-”表示阴性

Note:“-” indicated negative

2.4 菌株的化学特性 LYG2#基因组 G+C 含量为 66.6%,经德国 DSMZ 公司测定菌株 LYG2#合成的主要脂肪酸为 C18:1 ω7C (44.54%)、C16:0 (14.27%)、C19:0 CYCLO ω8C (12.16%) 和 C12:0 (4.76%)。主要呼吸醌为辅酶 Q8。

2.5 菌株的最适生长环境

2.5.1 菌株的最适生长盐浓度。LYG2#可耐受的盐浓度范围很广,最佳生长盐浓度为 9.6% (图 2)。

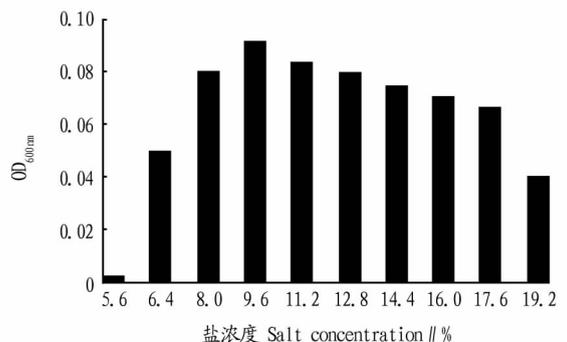


图 2 盐浓度对菌株 LYG2#生长的影响

Fig. 2 Effect of salt concentration on growth of the strain LYG2#

2.5.2 菌株的最适生长温度。LYG2#的最适生长温度为

32 °C (图 3)。

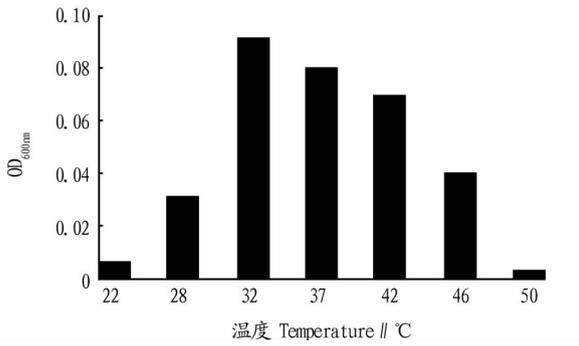


图 3 温度对菌株 LYG2# 生长的影响

Fig. 3 Effect of temperature on growth of the strain LYG2#

2.5.3 菌株的最适生长 pH。LYG2# 的最适生长 pH 为 8.5 (图 4)。

2.6 菌株 16S rRNA 序列分析与构建系统进化树 LYG2# 的 16S rRNA 基因序列全长为 1 502 bp (GenBank: JQ087462)。

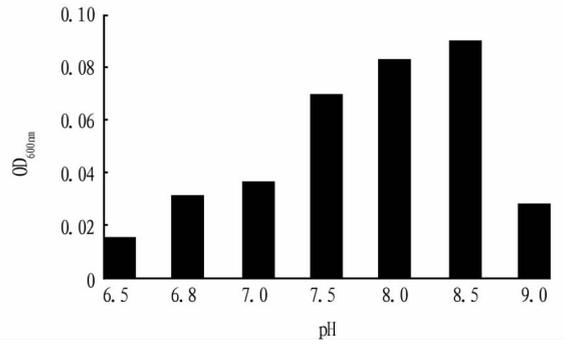


图 4 pH 对菌株 LYG2# 生长的影响

Fig. 4 Effect of pH on growth of the strain LYG2#

将测序得到的序列在 NCBI 中的 Blast 和 EzTaxon server 2.1 中分别进行比对,发现该菌株和最近的模式种 *Spiribacter salinus* M19-40^T 的相似度最高,为 95.98%,与其他模式种的相似度均在 95.00% 以下。分析系统发育学关系,获得进化树(图 5)。

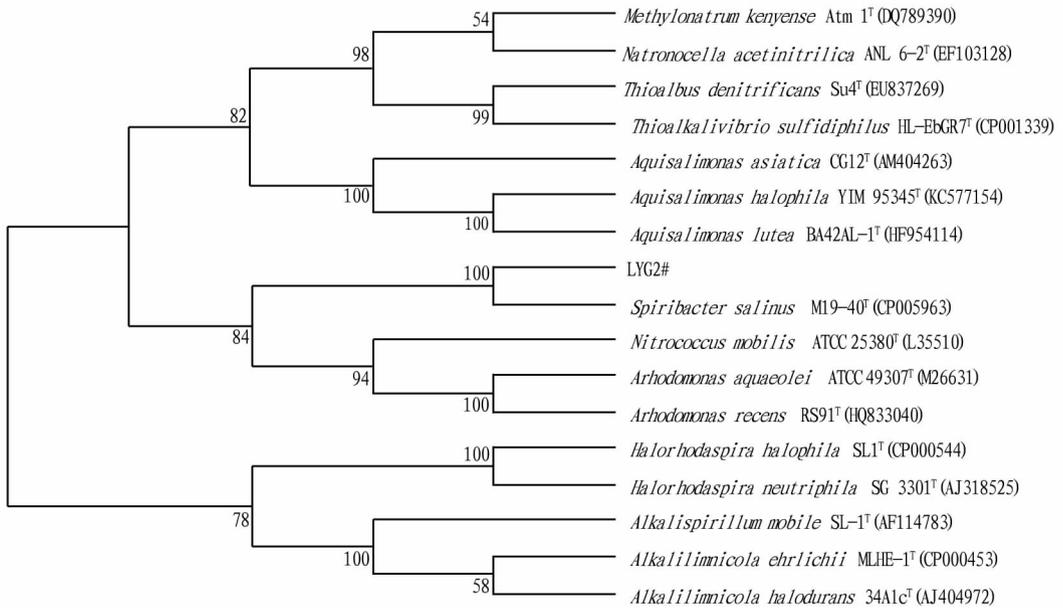


图 5 LYG2# 的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the strain LYG2#

从进化树上看,LYG2# 与 *Spiribacter salinus* M19-40^T 单独聚类在一起,与其他的菌种不在一个分支上,可以断定菌株 LYG2# 属于 *Spiribacter* 属。而 *Spiribacter* 属目前只有这一个有效的命名种^[9]。将菌株 LYG2# 与模式种 *Spiribacter sali-*

nus M19-40^T 进行了特征比较(表 3)。结果表明,LYG2# 与 *Spiribacter salinus* M19-40^T 大多数的特征是相似的,却又在最适盐浓度、最适温度以及主要脂肪酸含量上有所不同,表现出一定的独特性。

表 3 菌株 LYG2# 与 *Spiribacter salinus* M19-40^T 的特征比较

Table 3 Feature comparison of the strain LYG2# and *Spiribacter salinus* M19-40^T

菌株 Strains	形态 Form	革兰氏染色 Gram staining	菌落形态 Colony morphology	最适盐浓度 The optimum salt concentration %	最适温度 The optimum temperature °C	最适 pH The optimum pH	基因组 G + C 含量 The genome G + C content // %	脂肪酸 Fatty acids	呼吸醌 Respiratory quinone	MR	产 H ₂ S Producing H ₂ S
LYG2#	螺旋状	阴性	圆形粉红色	9.6	32	8.5	66.6	C18:1 ω7C (44.54%)	辅酶 Q8	阴性	阴性
<i>Spiribacter salinus</i> M19-40 ^T	螺旋状	阴性	圆形粉红色	15.0	37	7.5~8.0	62.7	C18:1 ω6C/ C18:1 ω7C (60.6%)	辅酶 Q8	阴性	阴性

分析、正交试验检验,发现狼蛛依靠嗅觉定位猎物果蝇最佳优化组合为狼蛛反应观察 300 s、果蝇组织液浓度 80%、间距 6 cm,在上述条件下狼蛛的化学感受器定位猎物的灵敏度最高。

表 5 最佳试验条件验证结果

Table 5 The optimum conditions to verify the results

试验方案 The experimental scheme	正确选择率 Correct selection rate	错误选择率 Wrong selection rate	无反应 No response
A ₂ B ₁ C ₁	0.475	0.175	0.300
A ₂ B ₁ C ₂	0.600	0.200	0.200
A ₁ B ₁ C ₁	0.525	0.225	0.250
A ₂ B ₂ C ₃	0.525	0.250	0.225
A ₃ B ₂ C ₁	0.525	0.250	0.225

该研究结果为探明游猎型蜘蛛与猎物之间的信息联系机制提供了基础资料,有利于后续进行狼蛛的其他感受器作用的探测,以得出狼蛛在猎食果蝇的过程中嗅觉感受器配合选择猎物作用的侧重点及综合效应。了解和掌握狼蛛的行为特性,对于最大限度地保护和利用天敌蜘蛛、有机地结合其他措施,在害虫管理中减少化学农药的使用、保护生态环境、协调害虫控制效果具有重要意义。

该试验是通过狼蛛定位猎物果蝇,然后在试验过程中利用距离、果蝇体内组织液浓度、观察时间观察狼蛛的反应和测定相关数值。试验过程中仍存在以下问题:①所选用的间距数量级范围较大。由于受四臂嗅觉仪的最短中心距离限制,结论所得出的最佳距离无法进一步缩小间距,因此,对有效间距的临界点有待进一步研究。②试验设备的振动隔音。无法对装置四周进行完全隔音,所以在试验过程中可能存在

一定回声或者是声音的干扰,从而对试验数据造成一定的影响。③气流问题。由于试验设备不够完善,无法测得试验中的详细流速,而且不少狼蛛在试验中出现被气流惊吓的情况,导致正确选择率水平明显低于文献报道的试验数据。

目前,国内对蜘蛛感受器选择方面的试验观察非常少,大多选择初始选择或最终选择,而试验全程观察记录狼蛛活动可发现狼蛛反应不同观察时长对正确选择率影响非常大,明显可见试验期间正确率高于初始或最终选择。该研究仅对拟水狼蛛的嗅觉作用进行了初步探测,以及狼蛛反应不同观察时长提出一定的试验设计依据,有关其具体的行为和作用机理有待进一步研究。

参考文献

- [1] 许春华. 中国狼蛛科的属级分类研究(蛛形纲:蜘蛛目)[D]. 保定:河北大学,2010.
- [2] LI J Q,ZHAO Z M,HOU J J. Study foreground of spider in plant protection [J]. Plant doctor,2000,13(6):9-12.
- [3] WEYGOLDT P. Communication in crustaceans and arachnids[M]//SE-BEOK T A. How animals communicate. Bloomington: Indiana University Press,1977:303.
- [4] GASKETT A C. Spider sex pheromones;Emission,reception,structures,and functions[J]. Biological reviews,2007,82(1):27-48.
- [5] DUMPERT K. Spider odor receptor:electrophysiological proof[J]. Experimentia,1978,34(6):754-756.
- [6] 强兆雨,李生才. 蜘蛛捕食行为的研究[J]. 山西农业科学,2007,35(12):37-39.
- [7] 吴六侠,王洪全. 拟水狼蛛(*Pirata subpiraticus* Boes. et. str)生物学研究[J]. 长沙水电师院学报(自然科学版),1986,1(1):78-81
- [8] 彩万志,庞雄飞,花保祯,等. 普通昆虫学[M]. 2版. 北京:中国农业大学出版社,2011:340-411.
- [9] 王立芹,杨俊英,唐龙妹,等. 单因素重复测量设计的方差分析及 SAS 与 SPSS 的实现[J]. 华北煤炭医学院学报,2005,7(1):17-19.
- [10] 杨向东. 利用 Excel 进行单因素随机区组产比试验结果的统计分析[J]. 农业网络信息,2009(5):131-133.

(上接第 7 页)

3 结论

从连云港青口卤水中分离纯化出一株嗜盐细菌 LYG2#, 并对该细菌进行了多项分类学鉴定。根据 16S rRNA 基因序列相似性、生理生化特性研究以及系统发育学分析,判断 LYG2# 为 *Spiribacter* 属的一个新种资源,命名为 *Spiribacter lygqingkouensis* sp. nov.。该菌可以耐受很广的盐浓度范围,其生长对盐浓度有严格的依赖性,是一株中度嗜盐菌。自然界中嗜盐微生物具有极其丰富的多样性,新发现的嗜盐微生物的数量也越来越多,人们对这些微生物的研究也逐渐深入,嗜盐菌在工业、农业、生物技术领域的应用也会越来越广泛。

参考文献

- [1] 沈萍. 微生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2000:23-324.

- [2] 李云海,于德爽,张培玉. 高盐度废水处理中优势耐盐菌鉴定与生长特性研究[J]. 青岛理工大学学报,2009,30(2):59-64.
- [3] 周培瑾. 嗜盐细菌[J]. 微生物学通报,1989,16(1):31-34.
- [4] KUSHNER D J. Microbial life in extreme environments[M]. London, United Kingdom: Academic Press,1978:317-368.
- [5] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [6] LALITHA M K. Manual on antimicrobial susceptibility testing[M/OL]. [2016-11-25]. <http://www.docin.com/p-55484591.html>.
- [7] GERHARDT P,MURRAY R G E,WOOD W A,et al. Methods for general and molecular bacteriology[M]. Washington,DC: American Society for Microbiology,1994.
- [8] SAITOU N,NEI M. The neighbor-joining method;A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol,1987,4(4):406-425.
- [9] LEÓN M J,FERNÁNDEZ A B,GHAI R,et al. From metagenomics to pure culture:Isolation and characterization of the moderately halophilic bacterium *Spiribacter salinus* gen. nov. sp. nov. [J]. Appl Environ Microbiol, 2014,80(13):3850-3857.