

一株积聚四氢嘧啶的青海湖盐单胞菌的分离及特性*

刘建¹ 李丹丹¹ 杨芳² 芮昊晨² 沈国平² 刘德立^{1**} 朱德锐^{1,2**}

(¹华中师范大学生命科学学院, 湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室 武汉 430079)

(²青海大学医学院 西宁 810016)

摘要 从青海湖采集20份水样, 利用RM高盐培养基分离获得35株嗜盐菌. 选取其中一株优势中度嗜盐菌QHL25进行形态学和生理生化特征分析, 结果表明: QHL25菌落圆形或椭圆形, 乳白色, 不透明, 中心突出, 边缘透明, 生长盐度为0~2.9 mol/L, 最适生长盐度为1.45 mol/L. 显微形态呈短杆状, 革兰氏染色呈阴性, 单个或成串排列. 最适生长pH为8.5, 最适生长温度为37 °C. 16S rDNA序列分析表明: 该菌株与盐单胞菌属 (*Halomonas* sp.) 相似性为98%; 结合形态特征和生理生化特征分析, 初步认定该菌株隶属于γ变形杆菌纲 (Gammaproteobacteria) 海洋螺菌目 (Oceanospirillales) 盐单胞菌科 (Holomonadaceae) 盐单胞菌属 (*Holomonas*). 薄层层析 (TLC) 定性分析可知QHL25胞内含有相容溶质四氢嘧啶; 高效液相色谱 (HPLC) 定量分析表明, 在1.7 mol/L的NaCl浓度下, 四氢嘧啶含量约为36.70 mg/g (细胞干重). 图6 表2 参30

关键词 青海湖; 盐单胞菌; 分离鉴定; 四氢嘧啶

CLC Q939.106

Isolation and Characteristics of a *Halomonas* sp. Accumulating Ectoine from Qinghai Lake*

LIU Jian¹, LI Dandan¹, YANG Fang², RUI Haochen², SHEN Guoping², LIU Deli^{1**} & ZHU Derui^{1,2**}

(¹Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

(²Medical College of Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract Thirty-five strains of halophiles were isolated from 20 water samples of the Qinghai Lake by a RM medium with high salinity. The moderate halophile QHL25 was selected and studied phenotypically, physiologically and phylogenetically. On the basis of its morphological and physiological characteristics, the isolate was round or oval-shaped, white and opaque as a single cell or in clusters. It was a Gram-negative rod that was able to grow at the salt concentration ranging from 0 to 2.9 mol/L (an optimum of 1.45 mol/L). The optimum pH and temperature for growth were 8.5 and 37 °C respectively. Based on the 16S rDNA gene sequence analysis, the halophile QHL25 had a 98% similarity with *Halomonas* sp. K1B-11. According to its morphological, physiological and biochemical characteristics combined with the sequence analysis of the 16S rDNA, strain QHL25 was preliminarily identified as a member of the genus *Holomonas*, which belonged to Oceanospirillales order of Gammaproteobacteria class. The intracellular compatible solute of ectoine accumulated in QHL25 could be detected by thin-layer chromatography and the content of ectoine was determined as 36.70 mg/g (cell dry weight) by high-performance liquid chromatography in the presence of 1.7 mol/L NaCl. Fig 6, Tab 2, Ref 30

Keywords Qinghai lake; *Halomonas*; isolation and characterization; ectoine

CLC Q939.106

地球上的盐域环境中生存着各种各样的嗜盐微生物, 其中中度嗜盐菌分布广泛. 目前, 已发现的中度嗜盐菌多数为盐单胞菌科 (*Halomonadaceae*) 的革兰氏阴性菌, 也有

其他科的好氧或兼性厌氧革兰氏阴性菌、好氧革兰氏阳性菌、产甲烷古菌或严格厌氧细菌. 其中盐单胞菌科革兰氏阴性菌多数属于盐单胞菌属 (*Halomonas*) 和色盐杆菌属 (*Chromohalobacter*) 两个属^[1]. 大多数中度嗜盐菌主要通过控制细胞内相容溶质的浓度来维持渗透压的平衡. 已经被发现的相容溶质包括糖类和糖苷类 (海藻糖、葡萄糖苷等)、氨基酸类 (谷氨酸、脯氨酸和谷氨酰胺等)、甜菜碱类 (甘氨酸甜菜碱、脯氨酸甜菜碱等)、四氢嘧啶和羟基四氢嘧啶以

收稿日期: 2011-10-28 接受日期: 2011-12-13

*国家自然科学基金项目 (No. 31060013) 资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31060013)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: deliliu2002@yahoo.com.cn; zhuderui2005@126.com)

及乙酰二氨基酸(乙酰鸟氨酸、乙酰赖氨酸等)^[2]。其中四氢嘧啶在多种中度嗜盐菌细胞中积累,在抵御外界高渗环境、稳定细胞内酶的活性方面发挥着重要作用,具有重要的研究价值和前景。因此,中度嗜盐菌作为一种新型微生物资源,不仅为微生物生理遗传和分类的研究提供新的课题,也为生物进化、生命起源的研究提供新的材料^[3]。

青海湖是青藏高原生物多样性最丰富的宝库,也是极端微生物基因资源的宝库,作为国家级自然保护区,被列入国际重要湿地名录。其海拔3 195 m,水温低,含盐度为13.23~14.04 g/L^[4],其中富集嗜盐微生物。目前,在我国西藏、新疆、内蒙古等西部地区盐湖^[5]、南极深海^[6]、东北地区盐田^[7]及舟山地区^[3]等地域,国内学者已陆续开展中度嗜盐菌的相关研究和多样性的调查,而对青海湖嗜盐菌的研究相对较少,尚存在大量未分离鉴定的种质资源。本研究从青海湖筛选分离得到35株嗜盐菌,获得全面的青海湖嗜盐菌种质资源,并利用形态学特征、生理生化特征结合16S rDNA基因序列分析鉴定其优势菌株。应用薄层层析(TLC)定性分析和高效液相色谱(HPLC)定量分析中度嗜盐菌QHL25胞内的四氢嘧啶含量,以期为进一步开发和利用青海湖嗜盐菌种质资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 2009年7月本实验室从青海湖20份水样中分离保存35株嗜盐菌种质资源。

1.1.2 主要试剂 酵母粉(Yeast extract)、细菌蛋白胨(Tryptone)购于英国OXOID公司;柠檬酸钠、葡萄糖、NaCl、KCl、MgSO₄·7H₂O、CaCl₂·2H₂O和琼脂粉等购于天津恒兴公司;细菌生理生化鉴定试剂盒、细菌DNA提取试剂盒和琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒分别来自北京路桥公司、上海赛百盛基因技术有限公司和爱思进生物技术有限公司;引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;Taq DNA聚合酶、dNTP均购自Fermentes公司;四氢嘧啶(Ectoine)标准品(95%)购于德国Fluka公司。

1.1.3 主要仪器 电热恒温干燥箱(PH050,上海实验仪器厂);电子天平(PL203 METTLER TOLEDO公司);小型高速冷冻离心机(5424型, Eppendorf公司);PCR仪(Eppendorf公司);超纯水纯化仪(HEAL FORCE EASY公司);恒温摇床(ZD-85,上海精达公司);恒温培养箱(ZHWY-100B,上海智城公司);无菌操作台(上海博讯公司);754紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司);高效液相色谱(Agilent Technologies 1200 series)。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离和形态特征观察 菌种分离和富集培养采用

RM培养基($\rho/\text{g L}^{-1}$): NaCl 50.0, 无水MgSO₄ 9.7, 柠檬酸钠 3.0, KCl 2.0, 无水CaCl₂ 0.2, 细菌蛋白胨 10.0, 酵母抽提物 2.0, 调节pH 7.5。固体培养基加琼脂15 g, 121 °C灭菌15 min, 保存备用。

水样直接加到液体培养基中(1:100), 120 r/min、37 °C恒温振荡培养3 d。取培养液10 μL , 稀释涂布平板(1:1 000), 37 °C恒温培养, 依据菌落形态(形状、大小、颜色及表面特征), 挑取单菌落划线纯化3~4次, 将最后一次挑取的单菌落接入液体培养基, 振荡培养12 h, 10%甘油, -20 °C冻存备用。在RM固体培养基上观察菌落形态, 采用革兰氏染色法在光镜下观察菌体形态。

1.2.2 生长特性研究 耐盐度试验参考文献[8]: 过夜培养菌株, 以1%接种量接种于不同NaCl浓度梯度(0~3.0 mol/L)的RM培养液中, 每个梯度3组平行, 150 r/min、37 °C振荡培养12 h, 用722分光光度计测定 $D_{600\text{ nm}}$, 求其平均值。

最适生长温度试验参考文献[8]: 将菌株接种于含0.86 mol/L NaCl的RM液体培养基中, 分别置于10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、37 °C、40 °C、45 °C温度梯度中, 每个梯度3组平行, 150 r/min振荡培养12 h, 检测培养液的 $D_{600\text{ nm}}$ 值, 求其平均值。

pH值对生长影响的测定参考文献[9]: 将纯化菌株接种于pH 3~12的含0.86 mol/L NaCl的RM液体培养基中, 每个梯度3组平行, 150 r/min、37 °C振荡培养12 h, 检测其 $D_{600\text{ nm}}$ 值, 求其平均值。

1.2.3 生理生化特性研究 碳氮源利用实验和生理生化测定参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰氏细菌鉴定手册》(第8版)^[10~11]。细菌生理生化鉴定按照试剂盒操作说明进行。

1.2.4 基因组总DNA的抽提与16S rDNA的PCR扩增及测序 总DNA提取按照细菌基因组DNA抽提试剂盒说明进行。扩增16S rDNA基因的引物为细菌通用引物, 即正向引物为27F: 5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG3'; 反向引物1492R: 5'CTACGGTTACCTTGTTACGAC3'^[12]。PCR扩增条件: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性1 min, 55 °C退火30 s, 72 °C延伸1 min, 35个循环, 最后72 °C延伸7 min。以试剂盒纯化PCR产物, 由上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.5 构建系统发育树 将菌株QHL25的16S rDNA序列与GenBank数据库进行BLAST比对, 获得相似性较高的相关菌株, 同时结合与该菌株相关邻近的典型菌株16S rDNA序列, 采用Clustalx1.8软件进行多序列比对, MEGA4.0软件构建系统进化树^[13]。

1.2.6 四氢嘧啶的提取和检测 四氢嘧啶(Ectoine)的提取参照文献[14]。利用薄层层析对四氢嘧啶进行初步鉴定。以混合液($V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{甲酸}}:V_{\text{水}}=75:15:10$)为展层液(其中水为固定

相,有机溶剂为流动相)对样品进行分离,显色剂为溶于正丁醇的水合茚三酮,标准品四氢嘧啶作为对照,130℃加热5 min.

四氢嘧啶标准曲线的绘制:配制含有5、25、50、100、250、500 μg/L的四氢嘧啶标准品溶液.采用高效液相色谱检测,根据谱图的峰面积和浓度作标准曲线.检测条件:采用5 μm的Eclipse XDB-C18柱,波长是210 nm,流动相为乙腈-水(80:20, V/V),柱温20℃,压强400 bar,流速1.0 mL/min,运行时间6 min.

2 结果与分析

2.1 青海湖嗜盐微生物QHL25的分离筛选和生长特性分析

从青海湖20份水样中分离得到嗜盐菌种质资源35株,通过耐盐梯度试验,确定其生长盐度范围和最适生长盐度范围,参照嗜盐微生物分类标准^[15],进行初步分类.结果显示:水体中嗜盐微生物,中度嗜盐菌约占62.85%,轻度嗜盐菌约占22.85%,非嗜盐菌与耐盐菌约占14.28%,未分离出边界和极端嗜盐菌.通过耐盐梯度试验(图1),确立QHL25的

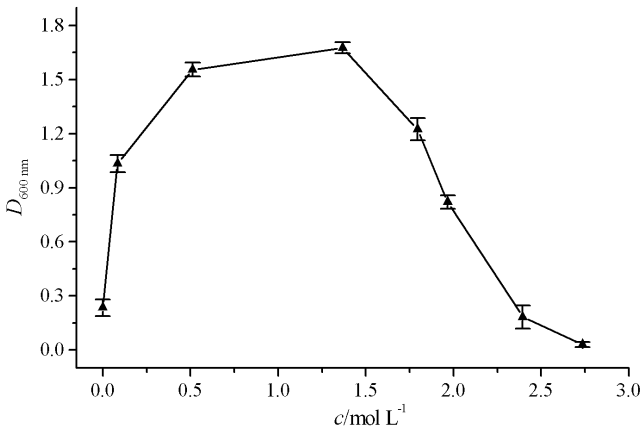


图1 NaCl浓度对菌株QHL25生长的影响
Fig. 1 Effect of NaCl concentration on the growth of strain QHL25

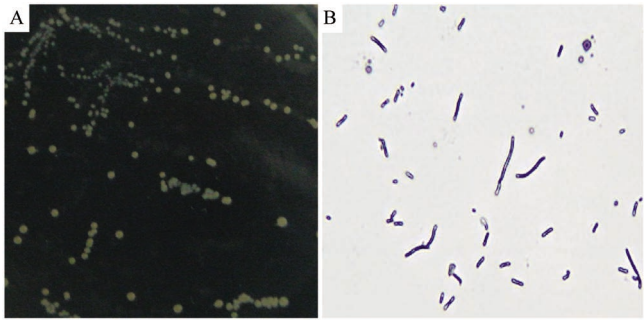


图2 嗜盐菌QHL25的菌落形态(A)和菌体形态(B)
Fig. 2 The colony morphology (A) and cell morphology (B) of strain QHL25

生长盐度为0~2.9 mol/L,最适生长盐度为1.45 mol/L,耐盐范围宽泛,依据分类标准,应属于中度嗜盐菌范畴,因此选择QHL25作为进一步研究的材料.形态特征研究(图2-A)显示:QHL25菌落圆形或椭圆形,乳白色,不透明,中心突出,边缘透明.显微形态呈短杆状,革兰氏染色呈阴性,单个或成串排列(图2-B).

通过Mg²⁺浓度对其生长影响的实验,结果表明:在0~1.6 mol/L的Mg²⁺浓度范围内,QHL25能良好生长,最适生长Mg²⁺为0.2~0.8 mol/L.通过研究不同pH和温度梯度对QHL25菌株生长的影响,结果表明:在pH为4.5~10、10~45℃的温度范围内,QHL25菌株能良好生长;最适生长pH为8.5,最适生长温度为37℃.

2.2 嗜盐菌QHL25的生理生化鉴定

参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰氏细菌鉴定手册》碳氮源利用和生理生化检测指标,对嗜盐菌QHL25进行了生理生化鉴定.该菌碳氮源利用范围较广(表1),能利用果糖、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、半乳糖、山梨糖醇、木糖、甘露糖、甘露糖醇、鼠李糖、棉子糖、海藻糖、阿拉伯糖、甘油、酵母提取物、胰蛋白胨、尿素、硫酸铵、硝酸铵、氯化铵、硝酸钾和硝酸钠作为碳氮源;不能利用蜜二糖、松三糖、乳糖、木糖醇、核糖、纤维二糖、可溶性淀粉、肌醇、肌酸、乙醇、丙酮和亚硝酸钠作为唯一碳氮源.对菌株QHL25进行了

表1 青海湖嗜盐菌QHL25的碳氮源利用情况

Table 1 Utilization of different carbon and nitrogen sources by QHL25

项目名称 Item	QHL25	项目名称 Item	QHL25	项目名称 Item	QHL25	项目名称 Item	QHL25
L-甘氨酸 Glycine	-	蔗糖 Sucrose	+	D-甘露糖 Mannose	+	肌酸 Creatine	-
L-谷氨酸 Glutamate	-	D-葡萄糖 Glucose	+	甘露糖醇 Mannitol	+	乙醇 Ethanol	-
L-异亮氨酸 Isoleucine	+	麦芽糖 Maltose	+	鼠李糖 Rhamnose	+	丙酮 Acetone	-
DL-苏氨酸 Threonine	-	蜜二糖 Melibiose	-	棉子糖 Raffinose	+	甘油 Glycerin	+
DL-色氨酸 Tryptophan	-	松三糖 Melezitose	+	海藻糖 Trehalose	+	酵母抽提物 Yeast extract	+
L-缬氨酸 Valine	+	D-半乳糖 Galactose	-	核糖 Ribose	-	胰蛋白胨 Tryptone	+
L-赖氨酸 Lysine	+	乳糖 Lactose	-	L-阿拉伯糖 Arabinose	+	尿素 Urea	+
L-苯丙氨酸 Phenylalanine	-	山梨糖醇 Sorbitol	+	纤维二糖 Cellobiose	-	铵盐 Ammonium salt	+
L-丙氨酸 Alanine	+	木糖醇 Xylitol	-	可溶性淀粉 Soluble starch	-	硝酸盐 Nitrate	+
D-果糖 Fructose	+	D-木糖 Xylose	+	肌醇 Inositol	-	亚硝酸钠 Sodium nitrite	-

+: 能利用生长; -: 不能利用生长 +: Growth; -: No growth

表2 嗜盐菌QHL25的生理生化指标检测结果
Table 2 The physiological and biochemical characteristics of strain QHL25

实验项目 Test item	结果 Result	实验项目 Test item	结果 Result	实验项目 Test item	结果 Result	实验项目 Test item	结果 Result
MR试验 MR: methyl red	-	鸟氨酸水解酶 Ornithine hydrolase	+	硫化氢试验 H ₂ S test	-	乙酸盐 Acetate	+
VP试验 VP: voges proskauer	-	七叶苷水解酶 Esculin hydrolyse	-	尿素酶 Urease	-	酒石酸盐 Tartrate	-
色氨酸 Tryptophane	-	胆汁七叶苷 Bile esculin	-	DNA酶琼脂 Dnase agar	-	乙酰胺琼脂 Acetamide agar	+
卫矛醇半固体 Dulcitol semisolid	-	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	+	木糖明胶培养 Xylose gelatin liquefaction	-	葡萄糖酸盐 Gluconate	-
丙二酸盐 Malonate	+	β -半乳糖苷酶试验 ONPG test	-	氧化酶试验 Oxidase test	+	SIM培养-吲哚 SIM indol medium	-
赖氨酸水解酶 Lysine hydrolase	+	明胶液化 Gelatin liquefaction	-	葡萄糖铵 Ammonium dextrose	-	SIM培养-动力 SIM power medium	+
精氨酸水解酶 Arginine hydrolase	+	酚红Glc肉汤 Phenol red dextrose broth	+	3% NaCl三糖铁 3% TSI Agar	-	葡萄糖产气 Glucose aerosis	-
1% NaCl-Glc产气 1% NaCl-glucose aerosis	ND	6.5% NaCl肉汤 6.5% NaCl broth	+	pH 9.6 Glc肉汤 pH 9.6 glucose broth	+	40%胆汁肉汤 40% Bile broth	+
硝酸盐肉汤 Nitrate broth	-	动力硝酸盐 Power nitrate	-	缓冲动力硝酸盐 Buffered power nitrate	-	硝酸盐产气 Nitrate aerosis	-
西蒙氏枸橼酸盐 Simmons citrate sodium	-	马尿酸盐 Sodium hippurate	-	粘液酸 Galactaric acid	-	嗜盐性试验 Halophilic test	+

+: 阳性; -: 阴性 +: Positive; -: Negative

40项生理生化指标的鉴定(表2), 其中QHL25的甲基红试验、VP试验、 β -半乳糖苷酶试验、明胶试验、动力硝酸盐、尿素酶、葡萄糖酸盐、吲哚试验等重要检测指标均为阴性, 氧化酶试验阳性、不产H₂S、嗜盐性试验阳性。结合16S rDNA的分子鉴定, 初步认定QHL25隶属于盐单胞菌属(*Halomonas*)。

2.3 嗜盐菌QHL25的16S rDNA分子鉴定与系统发育分析

以嗜盐菌QHL25的基因组DNA为模板, 利用细菌通用引物进行16S rDNA PCR扩增, 在1.5 kb处有一条特异性条带(图3)。纯化16S rDNA的PCR扩增产物, 并进行序列测定。结果表明, 嗜盐菌QHL25的16S rDNA大小为1 441 bp, GenBank的登录号为JN648705。

在GenBank中进行BLAST比对分析, 结果表明与菌株QHL25的16S rDNA序列相似性最高的是*Halomonas* sp. (No. FJ889578), 达到98%。选取邻近序列, 用Clustalx1.8进行序列

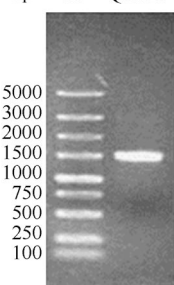


图3 菌株QHL25的16S rDNA琼脂糖电泳分析

Fig. 3 The analysis of 16S rDNA from strain QHL25 by agarose gel electrophoresis

比对分析, 再用MEGA 4.0软件包构建系统发育树(图4), 并结合其形态和生理生化特征, 初步确定QHL25与盐单胞菌同源, 分类定位为 γ 变形杆菌纲(Gammaproteobacteria)海洋螺菌目(Oceanospirillales)盐单胞菌科(Holomonadaceae)盐单胞菌属(*Holomonas*)。

2.4 嗜盐菌QHL25胞内四氢嘧啶的色谱检测

在1.7 mol/L的NaCl浓度下培养QHL25菌株, 乙醇法抽提胞内的四氢嘧啶, 利用薄层色谱对其进行初步鉴定, 以混合液($V_{\text{正丁醇}}:V_{\text{甲酸}}:V_{\text{水}}=75:15:10$)为展层液(其中水为固定相, 有机溶剂为流动相)对样品进行分离, 显色剂为溶于正丁醇的水合茚三酮, 标准品四氢嘧啶作为对照, 130 ℃加热5 min。计算 R_f 为0.31, 与标准品四氢嘧啶一致(图5)。

为获得理想的HPLC图谱, 在进行HPLC检测时, 将QHL25细胞提取物稀释40倍进样, 得到的四氢嘧啶标准物和QHL25细胞提取物的HPLC图谱, 结果显示四氢嘧啶标准物的出峰时间为1.237 min(图6-A), QHL25细胞提取物的出峰时间为1.235 min(图6-B), 两者峰形特征和出峰时间均一致, 说明QHL25胞内含有四氢嘧啶。根据不同浓度四氢嘧啶标准品HPLC谱图的峰面积和浓度作标准曲线, $y=12.82x-35.27$ ($R=0.99$)。经计算得知: 在1.7 mol/L的NaCl浓度下, 中度嗜盐菌QHL25胞内的四氢嘧啶含量为36.70 mg/g(细胞干重)。

3 讨论与结论

在大多数中度嗜盐菌中, 四氢嘧啶(Ectoine, 1,4,5,6-四氢-2-甲基-4-嘧啶羧酸)是主要的相容性溶质之一, 由于其具有手性模型, 难以运用化学方法来合成^[16]。最近的研究发

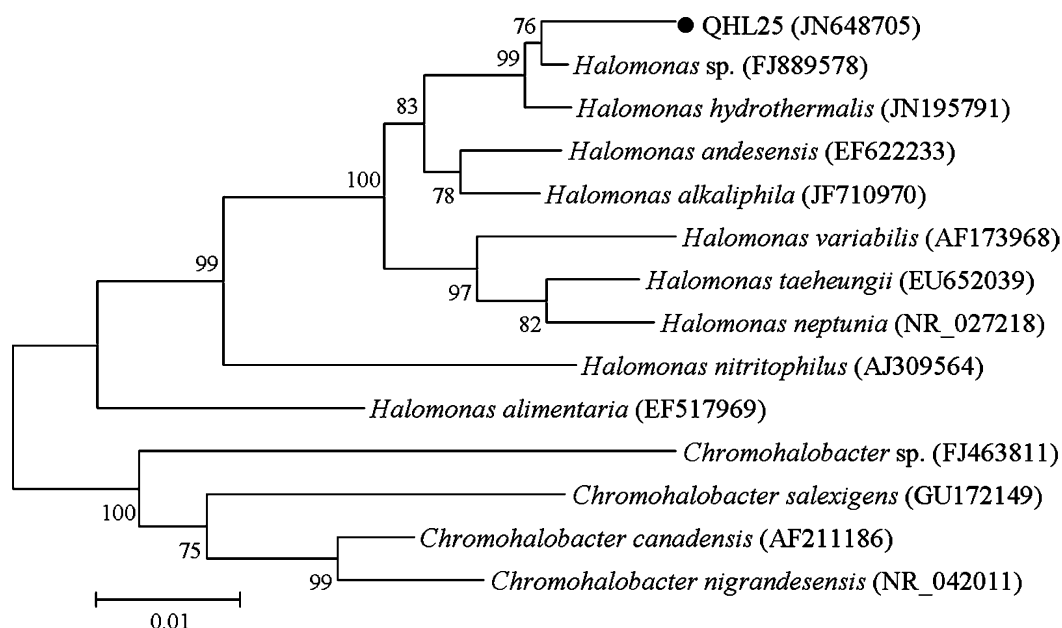


图4 菌株QHL25及其近源属种的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain QHL25 and related species based on 16S rDNA

现, 四氢嘧啶可以稳定天然蛋白质的水合层, 保护酶、DNA 等生物大分子和细胞膜结构, 帮助细胞抵抗冷冻、干旱、高

温、高盐、辐射等各种逆境因素的影响, 因而在酶制剂、制药和化妆品等方面显示出良好的应用前景^[17]. 截止到目前, 四氢嘧啶合成基因簇 $ectABC$ 已经在 *Marinococcus halophilus*^[18]、*Halomonas elongata*^[19]、*Chromohalobacter salexigens*^[20]、*Bacillus pasteurii*^[21]、*Halobacillus dabanensis* D-8^T^[22]、*Methylobacterium alcaliphilum* 20Z^[23]、*Nesterenkonia halobia* DSM 20541^[24]等属种中被成功克隆. 部分极端嗜盐菌、大多数中度嗜盐菌和少数耐盐菌均以四氢嘧啶为主要的相容溶质. 诸如 *Brevibacterium*、*Bacillus*、*Streptomyces*、*Methylobacterium*、*Ectothiorhodospira*、*Halomonas*、*Chromohalobacter*、*Vibrio*、*Salinivibrio*、*Halobacillus*、*Marinococcus*等属种, 均能检测出四氢嘧啶的存在. 尤其是 *Halomonas*属中, 几乎所有种都能够合成四氢嘧啶, 并作为细胞的主要相容溶质^[25]. 关于四氢嘧啶制备效率的研究, 主要集中在菌株筛选及制备工艺等方面. 四氢嘧啶的合成研究

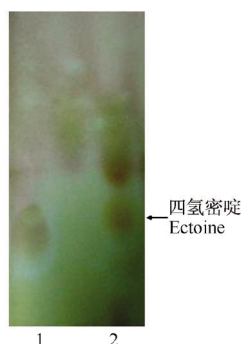


图5 菌株QHL25胞内四氢嘧啶薄层色谱

Fig. 5 Analysis of ectoine in *Holomonas* sp. QHL25 by TLC
1: 标准品四氢嘧啶作为对照; 2: 菌株QHL25累积的四氢嘧啶和其它氨基酸
1: standard ectoine was used as control; 2: ectoine and other amid acids in *Holomonas* sp. QHL25

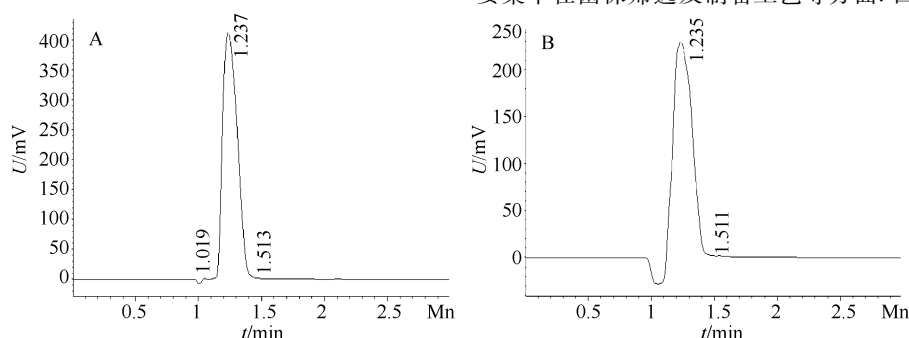


图6 HPLC检测四氢嘧啶标样 (A) 和QHL25细胞提取物 (B)

Fig. 6 HPLC spectra of standard ectoine (A) and QHL25 cell extraction (B)

现已在嗜盐海球菌 (*Marinococcus halophilus*)、肋生盐弧菌 (*Vibrio. costicola*)、盐单胞菌属 (*Halomonas*) 及芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 等多种微生物中报道^[26-29]。因此, 选择易于培养、能耐受高盐和胞内四氢嘧啶积累量大的菌株, 对于后期工程应用研究具有极为重要的实际意义^[30]。

笔者通过从20份水样中, 筛选分离出35株嗜盐微生物, 其中中度嗜盐菌占62.85%, 生长优势菌为15株。如QHL25, 生长盐度为0~2.9 mol/L, 最适生长盐度为1.45 mol/L, 耐盐范围宽泛, 此与该菌株生存的特殊环境条件相关, 青海湖属内陆盐湖, 缺氧低压, 温差大, 水体盐度为13.23~14.04 g/L, pH值在8.5~9.2之间, 微生物生理生化适应性和抗逆性强。对积累四氢嘧啶的中度嗜盐菌QHL25进行形态学和生理生化特征研究, 结合16S rDNA鉴定, 初步认定该菌隶属于 γ 变形杆菌纲 (Gammaproteobacteria) 海洋螺菌目 (Oceanospirillales) 盐单胞菌科 (Holomonadaceae) 盐单胞菌属 (*Holomonas*), 但未能鉴定到种, 可能是潜在的新种。应用薄层层析 (TLC) 和高效液相色谱 (HPLC) 定性和定量分析中度嗜盐菌QHL25胞内四氢嘧啶的含量。在1.7 mol/L的NaCl浓度下, 菌株QHL25胞内的四氢嘧啶含量为36.70 mg/g (细胞干重)。研究可为进一步探讨合成四氢嘧啶的优化条件、嗜盐菌的嗜盐机制和嗜盐基因簇*ectABC*的调控奠定坚实的基础。

References

- Wang KR (王魁荣), Zhang SJ (张树军), Li SH (李少贺), Sang XX (桑小雪), Bai LH (白林含). Osmotolerance property and mechanism of a moderately halophilic bacterium *Halomonas* sp. NY-011. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2010, **16** (2): 256~260
- Zhang BS (赵百锁), Yang LF (杨礼富), Wang L (王磊), Lu WD (卢伟东), Yang SS (杨苏声). Study progress on compatible solutes in moderately halophilic bacteria. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2007, **47** (5): 937~941
- Zhou XH (周旭华), Wu M (吴敏). Phylogenetic analysis of twenty-six halophiles from Zhoushan Islands. *Mod Agricul Sci* (现代农业科学), 2009, **16** (4): 44~45
- Zhang EL (张恩楼), Shen J (沈吉), Wang SM (王苏民), Yin Y (尹宇), Zhu YX (朱育新), Xia WL (夏威岚). Quantitative reconstruction of Qinghai Lake salinity during the past 0.9 ka. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2004, **49** (7): 697~701
- Tohty T (迪丽拜尔·托乎提), 旭格拉 (Xu QL), 穆尔特扎 (Murtiza), 热则宛古丽 (Rizwangul), 阿曼古丽 (Amangul), 纪婷 (Ji T), 迪丽乌孜 (Diluz). Physiological and biochemical characteristics of halophilic archaea isolated from Lop Nur surrounding region in Xinjiang and gene sequence of 16S rRNA, China. *Biotechnology* (生物技术), 2009, **19** (5): 16~20
- Chen ZL (陈志亮), Fu YN (傅英楠), Jiang WY (姜蔚宇), Chen RZ (陈荣忠). Characterization of the *ectC* gene and its expression product in *Halomonas* sp. Nj223 from Antarctica deep-sea sediment. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2007, **47** (2): 363~365
- Cui CX (崔春晓), Dai MX (戴美学), Xia ZJ (夏志洁). Phylogenetic diversity of endophytic moderately halophilic bacteria isolated from *Suaeda salsa* L. *Microbiol Bull* (微生物学通报), 2010, **37** (2): 204~210
- Ron U, Masahiro K. *Alkalibacillus silvisoli* sp. nov, an alkaliphilic moderate halophile isolated from non-saline forest soil in Japan. *Int J Syst Evol Micr*, 2007, **57** (1): 770~774
- Zhang XM (张晓梅), Dou WF (窦文芳), Xu HY (许泓瑜), Xu ZH (许正宏). Identification of a lipase producing halophilic strain and its halophilic mechanism. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2010, **16** (1): 100~103
- Dong XZ (东秀珠), Cai MY (蔡妙英). Identification of common bacterial system manual. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 2001. 53~364
- Buchanan RE, Gibans NE. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Version 8). Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 1984
- Xie Y (谢莹), Lin LB (林连兵), Ji XL (季秀玲), Wei YL (魏云林). Isolation and 16S rRNA gene sequence analysis of a thermotolerant halophilic bacterium. *Microbiol Bull* (微生物学通报), 2008, **35** (2): 166~170
- Liu XG (刘旭光), Zhang J (张杰). 分子生物学软件应用. Beijing: Peking University Medical Press (北京: 北京大学医学出版社), 2007
- Zhou YH (周月慧), Zhang LH (张苓花), Wang F (王飞), Shinichi N (永田进一), Wang YJ (王运吉). Study on the ectoine synthesis with moderately halobacterium SL21. *J Henan Univ Technol* (河南工业大学学报), 2006, **27** (2): 81~85
- Chao WJ (曹卫军), Shen P (沈萍), Li ZY (李朝阳). 嗜极微生物. Wuhan: Wuhan University Press (武汉: 武汉大学出版社), 2004. 1~19
- He J (何健), Wang T (汪婷), Sun JQ (孙纪全), Gu LF (顾立锋), Li SP (李顺鹏). Isolation and characteristic of a moderately halophilic bacterium accumulated ectoine as main compatible solute. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 2005, **45** (6): 427~431
- Fu YN (傅英楠), Chen ZL (陈志亮), Jiang WY (姜蔚宇), Chen RZ (陈荣忠). Isolation and characteristic of a moderately halophilic bacterium NJS2 accumulated ectoine from antarctica deep sea sediment. *J Xiamen Univ* (厦门大学学报), 2008, **47** (3): 4~6
- Louis P, Galinski EA. Characterization of genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine from *Marinococcus halophilus* and osmoregulated expression in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 1997, **143**: 1141~1149
- Goller K, Ofer A, Galinski EA. Construction and characterization of

- a NaCl-sensitive mutant of *Halomonas elongata* impaired in ectoine biosynthesis. *Fems Microbiol Lett*, 1998, **161** (2): 293~300
- 20 Canovas D, Vargas C, Calderon MI, Ventosa A, Nieto JJ. Characterization of the genes for the biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halomonas elongata* DSM 3043. *Syst Appl Microbiol*, 1998, **21** (4): 487~497
- 21 Kuhlmann AU, Bremer E. Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microb*, 2002, **68** (2): 772~783
- 22 Zhao BS, Lu WD, Yang LF, Zhang B, Wang L, Yang SS. Cloning and characterization of the genes for biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8^T. *Curr Microbiol*, 2006, **53**: 183~188
- 23 Reshetnikov AS, Khmelenina VN, Trotsenko YA. Characterization of the ectoine biosynthesis genes of haloalkalotolerant obligate methanotroph "*Methylococcium alcaliphilum* 20Z". *Arch Microbiol*, 2006, **184**: 286~297
- 24 Zhang B, Bao X, Wang L, Yang SS. Cloning and characterization of the gene cluster for biosynthesis of ectoine from *Nesterenkonia halobia* DSM 20541. *J Microbiol*, 2008, **46** (3): 309~318
- 25 Zhu DC (朱道辰), Liu XR (刘杏荣). Compatible solutes ectoine and its derivate hydroxyectoine. *Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2011, **31** (2): 95~101
- 26 Thomas S, Galinski EA. Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **57** (3): 306~313
- 27 Frings E, Kunte HJ, Galinski EA. Compatible solutes in representatives of the genera *Brevibacterium* and *Corynebacterium*: Occurrence of tetrahydropyrimidines and glutamine. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, **109** (1): 25~32
- 28 Galinski EA, Trüper HG. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol Rev*, 1994, **15** (2/3): 95~108
- 29 Severin J, Wohlfarth A, Galinski EA. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J Gen Microbiol*, 1992, **138** (8): 1629~1638
- 30 Zheng X (郑昕), Ma H (马虹), Yan XW (阎喜文), Zhang LH (张苓花). Ectoine synthesis and release under osmotic shock in *Halomonas venusta* DSM4743. *Microbiol Bull* (微生物学通报), 2010, **37** (7): 1090~1096