

极端嗜盐古菌分类学研究进展

王 爽¹, 杨 谦¹, 孙 磊², 王 允¹, 刘 丹³

(1. 哈尔滨工业大学 生命科学与工程系 黑龙江 哈尔滨 150001; 2. 黑龙江省农业科学院 土壤肥料与环境资源研究所 黑龙江 哈尔滨 150086;
3. 河北科技师范学院 生命科技学院, 河北 秦皇岛 066004)

摘 要: 极端嗜盐古菌因其具有特殊的细胞结构、生理机能和遗传基因, 是一类重要的极端微生物资源。它不仅对研究生命的极限、微生物的分类与进化等方面有理论意义, 而且在环境改造、开辟微生物新的功能等方面有重要的应用价值。文章对极端嗜盐古菌的分类学研究历史、分类学方法以及目前极端嗜盐古菌的分类状况作以具体的阐述。

关键词: 极端嗜盐古菌; 多相分类; 分类地位
中图分类号: Q 914. 83 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)12—0219—03

在地球上生存着一些远比我们人类古老的生物, 它们已经适应了地球初期极端恶劣的环境, 并有着十分强大的自我保护机制使得它们得以在今天仍然在高盐、高热、高压的极端环境中繁衍生息, 它们就是极端微生物(Extremophiles)。为了在极端环境下完成所有的生命化学过程并保持内环境的稳定, 极端微生物形成了许多普通微生物所没有的特性。极端嗜盐古菌(Extremely halophilic archaeon)就是其中的一类, 它们的生长至少需要 1.5 mol/L NaCl, 在含 2.5~5.2 mol/L 盐的培养基中生长最好, 很多能够在饱和 NaCl 浓度下生长。它们主要分布于天然或人工高盐环境中, 如海洋、盐(碱)湖、晒盐场、盐矿、人工腌制品等^[1]。极端嗜盐古菌由于其特殊的进化地位和潜在的应用价值, 已成为微生物生理、生化、生态及进化学家的重要研究对象。

1 极端嗜盐古菌分类学的研究历史

据记载, 早在 5 000 年前我们的祖先就对盐田中红池的现象有过描述, 古埃及人以及圣经也都曾对这类现象做过记录。达尔文(1839 年在做环球旅行过程中)是第一个意识到水体的红色源于其中生活的微生物的人。直到 1914 年 Pierce 才第一次从盐水环境中分离并描述了这些红色的微生物^[2]。

早期对极端嗜盐古菌的分类学研究仅在有限的形

态和生理生化实验基础上开展起来的, 因此存在着很多有争议的地方。随着生命科学的不断发展, 新的方法和技术的不断涌现并应用到分类学领域, 使得分类学一直都处在肯定到否定、再到肯定的发展规律中。现将极端嗜盐古菌的分类学发展阶段简要介绍如下^[3-4]。

1.1 初期(19 世纪 70 年代到 20 世纪 70 年代)

对于极端嗜盐古菌的研究起源于对咸鱼和盐浸食品的保护。当时从变坏的盐浸物中人们看到淡红色的菌落, 对它们进行了描述, 从此拉开了对极端嗜盐古菌研究的序幕。早在 1919 年, Klebahn 首次就对分离自红色咸鱼中的菌株进行鉴定, 并将其命名为“*Bacillus halobius ruber*”。1940 年, Elazari-Volcani 建立了极端嗜盐古菌科的第一个属——极端嗜盐杆菌属(*Halobacterium*), 归属于假单胞菌科(Pseudomonas), 其典型种为 *H. salinarum*。1974 年, 盐杆菌科(Halobacteriaceae)建立, 1984 年被 Gibbons 正式列入《伯杰氏鉴定细菌学手册》第 8 版^[5], 但是只包括盐杆菌属(*Halobacterium*)和盐球菌属(*Halococcus*)。直到 Woese 的三域假说的提出(1977 年)^[6], 极端嗜盐菌才从细菌域划分到古菌域。

1.2 中期(20 世纪 70 年代末到 90 年代初)

随着极端嗜盐古菌数目的增加, 以及数值分类、化学分类和基因型分析等分类学方法的应用, 使得极端嗜盐古菌各成员的分类学地位必须进行重新确定。1979 年 Colwel 等用数值分类方法对 *Halobacterium* 属中各种进行研究, 确定了一个新种, 合并了一个已知种。1984 年 Tindall 等人^[7]从非洲东部碱湖分离到大量嗜盐嗜碱古菌, 通过其生理特征及分子生物学数据的分析, 提出嗜盐嗜碱杆菌属(*Natronobacterium*)和嗜盐嗜碱球菌属(*Natronococcus*)作为嗜盐菌科的 2 个新属。1986 年 Torreblanca 等人^[8]又通过较系统的数值分类方法(包括

第一作者简介: 王爽(1981-), 女, 辽宁人, 在读博士, 研究方向为嗜盐微生物的分离及分类。
通讯作者: 杨谦(1959-), 男, 黑龙江人, 教授, 博士生导师, 研究方向为植物病理, 植物病害生物防治, 环境微生物及生物防治微生物基因工程和基因组研究。E-mail: yangq@hit.edu.cn。
基金项目: 国家“863”资助项目(2006AA10Z424)。
收稿日期: 2010-04-10

极性脂成分)对所分离到的中性嗜盐菌进行详细分析,将盐杆菌属分成盐杆菌属(*Halobacterium*)、盐小盒属(*Haloarcula*)和盐富饶属(*Haloferax*)。在1989年的系统细菌学鉴定手册第3卷^[9]中,嗜盐古菌的成员已被划到 *Halobacterium*, *Haloecoccus*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Natronobacterium* 和 *Natronococcus* 的6个属中。

1.3 近期(20世纪90年代至今)

从1995年开始,极端嗜盐古菌的研究才真正进入蓬勃发展的时期。以16S rRNA基因序列为基础的核酸分析以及DNA-DNA杂交,基因组DNA的C+C mol%的测定,结合比较成熟的化学分类方法(主要为极性脂)和经典的形态学、生理学方法,对其进行综合分析,对极端嗜盐古菌中争议的种进行重新定位,理清了长期由于分类技术的局限所造成的分类地位混乱的状态,预示着多相分类方法在极端嗜盐古菌的分类研究中的成熟运用。

1997年,Oren等根据细菌学国际委员会极端嗜盐菌分类学分会的讨论内容,提出嗜盐菌目(*Halobacteriales*)新分类单元描述的最低标准^[10],该标准以现代分类学中公认的、较科学的多相分类方法为根本指导原则,基本上涵盖了目前细菌分类学上适合嗜盐古菌分类研究的方法和手段,为极端嗜盐古菌分类学研究提供一个明确的框架。2001年由Grant等人建议另成立新纲^[11]—极端嗜盐古菌纲(*Halobacteria*)。2008年8月,国际原核生物系统分类委员会(ICSP)讨论 *Halobacteriaceae* 科的分类问题,随后Oren等人提出 *Halobacteriaceae* 科内各属描述的修改^[12],进一步明确各属的分类学特征,为今后极端嗜盐古菌的鉴定工作提供参考。

2 极端嗜盐古菌的多相分类学研究方法

与细菌相同,极端嗜盐古菌分类学的研究也经历了从最初简单的表型和生理生化特征鉴定到后来的数值分类,再到分子分类的发展阶段。但传统分类、化学分类和分子分类采用的都是微生物某方面的特征,有各自的局限性。为了使物种间的系统进化关系更能接近自然分类系统,目前普遍采用Colwell于1970年提出的多相分类的研究方法^[13]。多相分类综合利用微生物的表型、基因型和系统发育的信息,可用于各级分类单位的描述,是目前公认的最有效的微生物分类方法,与分子系统学一并成为细菌分类学发展史上的两大里程碑。

2.1 传统分类

传统分类方法也称描述分类,是指根据一些表观分类特征,包括形态特征、培养特征、生理生化特征等对微生物分类单位进行描述的一种分类方法。适合于科、属、种甚至亚种的分类的正式描述。随着现代科学技术的发展,传统分类一度受到现代分类学的冲击,但事实证明,传统分类仍然是多相分类学研究的基础,是不可

替代的。

2.2 数值分类

数值分类是根据微生物分类学信息,应用计算数学原理和技术辅助定义微生物分类单位的方法。主要通过考察和计算细菌的形态特征及活体细胞的生理生化特征等表型特征,得出相似性矩阵而确定任何一对菌株之间的相似性程度。通过聚类分析所得出的树状图可以揭示同一表观群内菌株表型的一致性。针对于数值分类的费力费时的缺点,较为成熟的API和Biolog表型鉴定系统目前已广泛应用于微生物鉴定过程中^[14]。

2.3 化学分类

由于微生物细胞特定化学组分及分子结构的稳定性好,因此利用不同的化学特性对生物个体进行分类鉴定也是极端嗜盐古菌系统分类的主要方法之一。常用的化学分类方法包括细胞壁化学组分分析、磷酸类脂分析、脂肪酸分析、异戊烯酰分析、全细胞蛋白及核糖体蛋白电泳分析等。化学分类可以在较短的时间内对菌株进行归类,因此是比较大量菌株的快速分类方法。

2.4 分子分类

由于嗜盐菌的形态、细胞的化学组成在不同盐度条件下会发生不同程度的改变,因此仅从表型和化学特征上很难判断其正确的分类地位。因此,在分子水平上对生物个体的DNA、RNA和蛋白质进行研究的分子分类就成为了确定嗜盐菌的分类地位和系统发育关系的关键方法。目前经常使用的分子分类方法包括DNA G+C mol%测定、DNA分子指纹分析、DNA-DNA杂交和核酸序列分析等。DNA-DNA的亲缘关系在微生物种的确定中起决定性作用。目前认为,在表型特征高度相似的情况下,DNA-DNA杂交值 $\geq 70\%$ 为细菌种的界限,即与亲缘关系最近的种之间的DNA-DNA杂交值 $< 70\%$ 可以定义为新种。而从16S rRNA基因序列同源性角度,一般的标准是同源性 $\geq 97\%$ 时可认为是一个种。但从最近发现的新种来看,16S rRNA基因序列的同源性 $> 99\%$ 的,其DNA-DNA杂交值也可能低于 70% ^[15]。因此,要确定一个新种需综合多种指标,采用多相分类的方法进行研究。

对于某一特定生物而言,多方面的信息可以覆盖其基因组的很大部分,生物之间的多样性通过大量的不同分子表现出来,因此任何能够揭示出这一可变性某一部分的特征都是有用并值得考虑的,这就是多相分类方法的稳定性和它取代单项分类系统的根本原因。多相分类更多的是一种经验,无严格的规则或指导方针,它可以把生物全部有意义的信息整合到一起并得出一个“多数符合”的分类,其分类结果只能满足大多数而不是所有使用者的要求。

3 极端嗜盐古菌的组成

近年来,随着分离技术和方法的革新、新环境样品的增加,嗜盐古菌物种数量也在不断扩大;与此同时,伴随着分类学的发展、观念和方法的改变,已分离的嗜盐古菌的分类学地位也在不断调整。通过大量的 16S rRNA 基因序列比对和化学分类特征(尤其是极性脂的组成)分析,将极端嗜盐古菌划分在古菌域(Archaea)、广古菌门(Euryarchaeota)、嗜盐菌纲(Halobacteria)、嗜盐菌目(Halobacteriales)下的盐杆菌科(Halobacteriaceae)^[1]。盐杆菌科由 1997 年的 9 个属^[10]发展到 2002 年的 15 个属^[6],到 2005 年 12 月,分类命名的嗜盐古菌增加到 21 个属^[17],截止到 2008 年 9 月,盐杆菌科包含 27 个属,正式公布名字的种达 96 个^[12]。这些微生物的名字及相关信息可在 <http://www.bacterio.cict.fr/> 中查询到。

4 展望

极端嗜盐古菌经过漫长年代对高盐环境的适应与进化,形成其独特的结构、遗传特性和生理功能,已成为微生物生理、化学、生态、及进化学家研究的重要对象。开展极端嗜盐古菌的研究对于推动生命科学的深入开展和加快我国微生物产业的发展及微生物资源的开发利用具有重要意义。

我国特殊的地理环境,赋予了得天独厚的极端微生物资源。我国的嗜盐古菌分类研究工作开展于 20 世纪 80 年代初,具有坚实的基础,并在不断的前进。相信随着研究范围的扩大、微生物分类学观念的不断革新,研究方法的不断改进,会有更多的极端嗜盐古菌得以发现、确定和承认。

参考文献

[1] 崔恒林,杨勇,迪丽拜尔·托乎提,等.新疆两盐湖可培养嗜盐古菌多样性研究[J].微生物学报,2006,46(2): 171-176.
[2] Oren A, Eleri R, Watanabe S, et al. *Halomicrobium mukohataei* gen. nov., comb. nov., and emended description of *Halomicrobium mukohataei* [J]. Int J Syst Evol Microbiol 2002, 52(5): 1831-1835.

[3] 许学伟.新疆地区嗜盐古菌的多相分类学和细菌视紫红质基因序列的研究[D].杭州:浙江大学,2005: 15-29.
[4] 张立丰.新疆达坂城盐湖嗜盐古菌 16S rDNA 序列分析和细菌视紫红质基因序列的研究[D].乌鲁木齐:新疆师范大学,2006: 4-10.
[5] 布坎南 E R, 吉布斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 中国科学院微生物所翻译组. 译. 北京: 科学出版社, 1989: 353.
[6] Woese C R, Fox G E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms[J]. Proc Natl Acad Sci, 1977, 74(11): 5088-5090.
[7] Tindall B J, Ross H N M, Grant W D. *Natronobacterium* gen. nov. and *Natronococcus* gen. nov., two new genera of haloalkaliphilic archaebacteria [J]. Syst. Appl. Microbiol 1984, 5: 41-57.
[8] Torreblanca M, Rodríguez Valera F, Juez G, et al. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov [J]. Syst Appl Microbiol, 1986(8): 89-99.
[9] Grant W D, Larsen H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. 1988: 2216-2233.
[10] Oren A, Ventosa A, Grant W D. Proposal of minimal standards for the description of new taxa in the order *Halobacteriales* [J]. Int J Syst Bacteriol 1997, 47: 233-238.
[11] Grant W D, Kamekum M, McGenity T J, et al. *Halobacteria* class nov. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [M]. 2nd ed. New York: Springer Verlag Press, 2001: 294-334.
[12] Oren A, Arahall D R, Ventosa A. Emended descriptions of genera of the family *Halobacteriaceae* [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59: 637-642.
[13] Colwell R R. Polyphasic taxonomy of the genus vibrio; numerical taxonomy of vibrio cholerae, vibrio parahaemolyticus and related vibrio species [J]. J Bacteriol 1970, 104: 410-433.
[14] Vandamme P, Pot B, Gillis M, et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics [J]. Microbiol Rev, 1996, 60(2): 407-438.
[15] Li W J, Schumann P, Zhang Y Q, et al. *Stackebrandt E & Jiang C L. Marinococcus habtolerans* sp. nov., isolated from Qinghai, north-west China [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55: 1801-1804.
[16] Oren A, Stackebrandt E. Prokaryote taxonomy online; challenges ahead [J]. Nature 2002, 419: 15.
[17] Yanfen X, Huapeng F, Ventosa A, et al. *Halalkalicoccus tibetensis* gen. nov., sp. nov., representing a novel genus of halobalkaliphilic archaeon [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55: 2501-2505.

Research Advances on Taxonomy of Extremely Halophilic Archaeon

WANG Shuang¹, YANG Qian¹, SUN Lei², WANG Yun¹, LIU Dan³

(1. Department of Life Science and Engineering Harbin Institute of Technology, Harbin, Heilongjiang 150001; 2. Soil Fertilizer and Environment Energy Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 3. College of Life Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao, Hebei 066004)

Abstract: Extremely halophilic archaeon was an important class of extreme microbial resources, due to its special cell structure, physiological function and genetics gene. It was very important for researching the limits of life, microbial classification and evolution. It was very valuable for environmental improvement, revealed new function of microorganisms. This paper described the extremely halophilic archaeon taxonomy related to the history, the methods, and the currently research status.

Key words: extremely halophilic archaeon; polyphasic taxonomy; taxonomic status