

# 盐湖微生物的分离培养及保藏方法

## Isolation and preservation of microorganisms in salty lake

刘永红<sup>1</sup>, 刘冰冰<sup>3</sup>, 李文均<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> 荒漠与绿洲生态国家重点实验室, 中国科学院新疆生态与地理研究所, 乌鲁木齐, 新疆; <sup>2</sup> 生命科学院, 中山大学, 广州, 广东; <sup>3</sup> 河南省工业微生物资源与发酵技术重点实验室, 南阳理工学院, 南阳市, 河南

\*通讯作者邮箱: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

### 方法一: 嗜盐细菌分离保藏方法

**摘要:** 盐湖环境具有高渗透压或高 pH 等特点, 生长条件苛刻, 但却蕴藏着丰富、独特、宝贵的嗜盐微生物资源, 如嗜盐细菌, 嗜盐放线菌和嗜盐古菌等。生长在高盐环境中的微生物往往需要一定的盐浓度, 从而保持正常生理所需的渗透势。因此, 在分离嗜盐菌时, 需在分离培养基中添加合适的盐, 以期获得具有不同渗透特性的微生物类群, 从而提高分离菌株的多样性。实验者也可根据自身样品的理化性质对分离培养基和培养条件进行优化和调整, 以达到更好的分离效果, 充分发掘盐湖环境微生物资源。本部分阐述的方法适用于分离盐湖中可培养嗜盐细菌。在实验室条件下分离培养盐湖环境中的嗜盐细菌, 初步了解盐湖可培养嗜(耐)盐细菌类群。本实验所获菌株根据需要, 分别采用以甘油为保护剂和以牛奶为保护剂的方法进行高效保藏, 为后续新分类单元的鉴定、功能菌株的筛选以及代谢产物的发掘提供优质的微生物资源。

**关键词:** 盐湖, 分离, 纯培养, 细菌, 保藏

### 材料与试剂

1. 无机盐: NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 丙酸钠, 柠檬酸三钠等;
2. 碳源或氮源: 可溶性淀粉, 葡萄糖, 甘油, 酵母粉, 蛋白胨, 干酪素, 纤维素等;
3. 成品培养基: Marine Broth 2216 (BD, Difco), R2A (青岛海博) 等;
4. 其它溶剂和试剂: 琼脂, 酪蛋白水解物, 脱脂奶粉, 甘油, 制霉菌素, Chelex, 等;
5. 实验用品和耗材: 研钵, 研磨棒, 涂布棒, 接种针, 90 mm 的无菌培养皿, 15 mL 无菌离心管, 100 mL 的锥形瓶, 各种型号的移液器吸头 (20 μL, 200 μL, 1000 μL), 天平, 记号笔, 酒精灯, 酒精喷灯, 安瓿瓶, 2 mL 的冻存管, 电磁炉等。

## 31 仪器设备

仪器名称	型号	生产厂家
立式压力蒸汽灭菌器	LDZH-100KBS	上海申安医疗器械厂
电热恒温培养箱	GHP-9160	上海天呈实验仪器制造有限公司
烘箱	XMTD-8222	上海精宏实验设备有限公司
迷你离心机	LX-200	江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司
小型振荡器	MS 3 basic	德国 IKA
PCR 仪	C1000	美国 Bio-RAD
洁净工作台	SW-CJ-2FD	上海博迅医疗生物仪器股份有限公司
电子精密天平	BSA 124S	德国 Sartorius
电子分析天平	TE 1502S	德国 Sartorius
冰箱	BCD-308W	青岛海尔股份有限公司
超低温冰箱	UXF70086V	Thermo SCIENTIFIC
摇床	TS-211B	上海天呈实验仪器制造有限公司

## 32 软件和数据库

34 MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>)

35 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)

### 36 1. 实验步骤 试验前准备

38 1.1 提前准备好实验样品, 根据样品数量和性质选择所要配置的培养基种类和用量;

39 1.2 计算所需物品的数量: 研钵, 100 mL 锥形瓶, 90 mm 培养皿, 涂布棒, 15 mL  
40 离心管, 10 mL 注射器, 0.22  $\mu$ m 无菌有机系滤膜, 不同规格的移液器吸头 (20  
41  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1,000  $\mu$ L) 等, 提前找好备用;

42 1.3 准备好适量的玻璃珠和蒸馏水等备用。

### 43 2. 分离培养基的配置

44 首先根据样品数量和试验重复计算所需培养基的用量, 然后根据配方称取和配制适  
45 量的培养基, 调至合适 pH, 高温灭菌后, 待培养基冷却至 50  $^{\circ}$ C 左右, 以 1 mL/L  
46 的浓度加入制霉菌素原液, 使之与无菌培养基充分混匀, 自然风干 2-3 d 备用。

注：每种培养基在配置过程中，可根据样品本身的特性和实验需要，设置不同盐梯度，如 5 %、10 %、15 %、20 % 和 25 % 等，以此添加不同质量的 NaCl 或者 KCl, NaCl 和 MgCl<sub>2</sub> 等复合盐。涂板时每个处理做 2 个重复。

培养基配方参考如下 (g/L)：

2.1 1/2 MA 培养基：取 Marine Agar 2216 培养基成品 18.7 g，琼脂 18 g, pH 7.2，于 121 °C 高压灭菌 30 min。

2.2 1/2 R2A 培养基：酵母粉，蛋白胨，酪蛋白水解物，葡萄糖，可溶性淀粉各 0.25 g；K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 丙酮酸钠 分别 0.15 g；MgSO<sub>4</sub> 0.001 g，琼脂 20 g, pH 7.2，于 121 °C 高压灭菌 30 min。

2.3 MGM 培养基：人工合成盐水，蛋白胨 5 g，酵母粉 1 g，琼脂 20 g。人工盐水组成：NaCl 190 g；MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 25 g；MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 30 g；KCl 15 g。盐水单独灭菌，基础培养基用 1M Tris-HCl 调制 pH 7.5，于 121 °C 高压灭菌 30 min，待温度冷却至 50-60 °C 时将人工盐水和基础培养基混合再倒板 (赵婉雨，2013)。

2.4 CCMS 培养基：纤维素 10 g，干酪素 0.3 g，KNO<sub>3</sub> 0.2 g，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g，CaCO<sub>3</sub> 0.02 g，FeSO<sub>4</sub> 0.01 g，KCl 20 g，MgCl<sub>2</sub> 30 g，NaCl 50/100/150 g，琼脂糖 15 g，pH 7.5 (田蕾等，2017)。

2.5 CM 培养基：酪蛋白水解物 7.5 g，酵母粉 10 g，柠檬酸三钠 3 g，KCl 2 g，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20 g，FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g，NaCl 200 g, pH 7.2 (顾晓颖等，2007)。

2.6 改良高氏一号培养基：可溶性淀粉 (Soluble starch) 20 g；KNO<sub>3</sub> 1 g；MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g (原培养基为 0.05 g)；K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g (原培养基为 0.05 g)；Agar 12 g；微量盐 1 mL (夏占峰等，2011)。

### 3. 样品预处理及稀释

#### 3.1 水样的预处理

对于水体中的嗜盐细菌，一般采用直接稀释涂布的方法。但为提高实验的可行性，可对水样中的菌体先通过滤膜处理进行富集。

##### 1) 直接稀释培养

a. 将水样按照 1: 100 的比例加入液体培养基中

b. 120 r/min, 37 °C 恒温振荡培养 2-3d (此时水体的稀释倍数为 10<sup>-2</sup>)

c. 继续将其稀释至 10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-4</sup> 备用

## 2) 滤膜富集

- a. 在无菌条件下，将水样混匀
- b. 用装有 0.22  $\mu\text{m}$  孔径滤膜的滤器过滤，在滤膜上富集菌体，用于富集的水样量达到 30 mL 时，取下滤膜
- c. 将上一步骤所得滤膜放入装有 3 mL 的无菌 5% NaCl 溶液的玻璃试管中 (此时水样的稀释倍数为  $10^{-1}$ )
- d. 继续用无菌的 5% NaCl 溶液将其稀释至  $10^{-3}$  和  $10^{-4}$  备用 (沈硕, 2017)。

## 3.2 底泥样品的预处理

对于底泥样品，通常采用直接分离的方法培养细菌，但也可根据不同的实验目的先进行选择富集再分离培养。

### 1) 直接分离培养

- a. 在无菌条件下称取 5 g 底泥样品，加入 45 mL 无菌的 5% NaCl 溶液的三角瓶内 (事先已装入玻璃珠并灭好菌)
- b. 于摇床中 120 r/min 充分振荡培养 30 min
- c. 静置，吸取上清液 (此上清液稀释倍数为  $10^{-1}$ )
- d. 继续用无菌的 5% NaCl 溶液将其稀释至  $10^{-3}$  和  $10^{-4}$  备用

### 2) 富集分离培养

- a. 称取 40 g 新鲜的底泥样品，加入装有 500 mL 已灭菌的富集培养基的富集瓶内
- b. 继续添加灭菌的富集培养液至瓶满，拧紧瓶盖达到密封效果，反复颠倒混匀
- c. 于 25  $^{\circ}\text{C}$  恒温富集培养，每天早晚各颠倒振荡一次
- d. 根据富集情况的不同，分别选择富集到 7 天，15 天或 30 天时的样品进行稀释涂布培养。

## 4. 平板涂布培养

分别取每个样品稀释至  $10^{-3}$  和  $10^{-4}$  浓度下的悬浊液 100  $\mu\text{L}$ ，涂布于各个分离培养基 (详见 2. 分离培养基的配置)；在涂布时用涂布棒将悬浊液充分涂匀，然后在每个培养皿上做好标签，一般需要包含培养基简称、样点名、稀释梯度及时间等信息，封口后放入培养箱 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 1-2 周，观察并记录生长情况。

## 5. 菌株分离纯化

待分离培养皿上的单菌落长到合适的丰度时，可开始下一步的纯化。依据菌落形态(形状、大小、颜色及表面特征)挑取单菌落。先用记号笔在培养皿的底部标记好待纯化的菌株，并将其按顺序编号。尽量全面挑取不同形态、颜色、大小的菌落以避免重复。挑选完成后，在超净工作台中利用接种针挑取单菌落到纯化板上，采用三区划线法进行纯化。菌株纯化过程中，需要对每株菌做好标记并进行不同编号处理。当菌株在培养基中获得形态一致的单一菌落时即获得微生物的纯培养物（菌株分离及纯化效果如图 1 所示）。

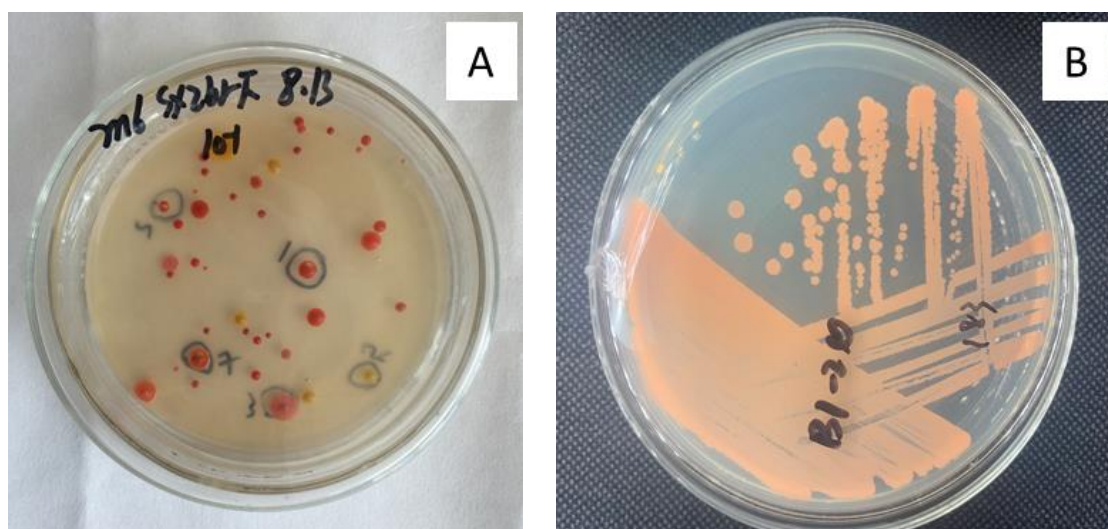


图 1. 菌株分离平板及纯化平板结果展示（A：分离板，B：纯化板）

## 6. 菌株 16S rRNA 基因鉴定

挑取的单菌落在纯化培养基培养 2-3 d 后，基本会形成较为明显的菌落，此时可根据菌株的生长状况进行分批测序鉴定。

6.1 挑取适量菌体到装有 50  $\mu$ L Chelex 溶液的 PCR 管中，溶液变浑浊即可

6.2 放入 PCR 仪器中，99  $^{\circ}$ C 加热 30 min

6.3 离心使细胞碎片及 Chelex 沉降到 PCR 管底部，同时上清液基本澄清，此时细菌遗传物质溶解在上清液中

6.4 加入 1  $\mu$ L 上清液至配制好的 PCR 体系中，特异性扩增细菌 DNA 中的 16S rRNA 基因，PCR 扩增程序如表 1 所示

6.5 扩增完成后将 PCR 产物送至生物公司测序



126

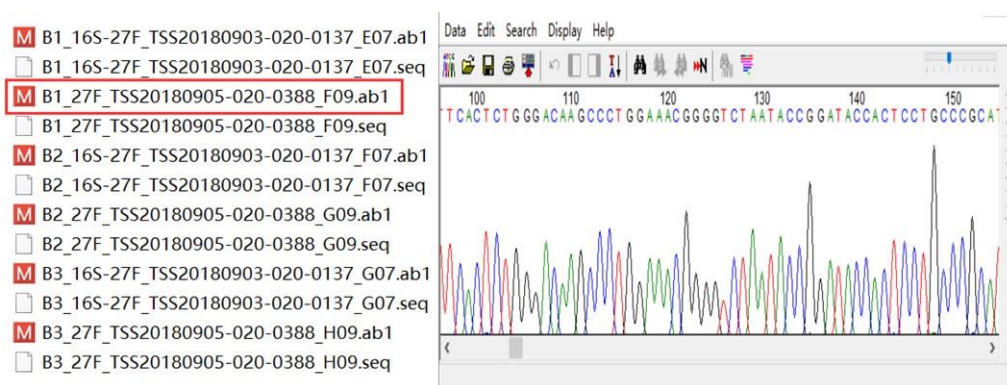
表 1: 细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增程序

温度	时长	目的
94℃	4min	预变性
94℃	1min	变性
56℃	30s	退火
72℃	1min30s	延伸
循环 32 次		
72℃	10min	延伸
4℃	∞	保存

127

## 128 7. 菌株系统发育学分析

129 7.1 所得测序结果中，选取格式为 ab1 的文件并用 MEGA 7.0 软件打开。读取相应  
130 的碱基序列，并根据测序峰的结果判断测序的可靠性，每个碱基位对应单一且  
131 明显的特征峰即为测序结果可靠(详见图 2)。



132

图 2. 采用 MEGA7.0 软件读取相应的测序结果

133

134 7.2 确定测序结果可靠之后，将其保存为 FASTA 格式的文件并粘贴到 EzBioCloud  
135 数据库进行比对，可得到最相似菌株。

136 7.3 根据该属的特性及不同的实验需求，选择相似性最高的前 30 或者前 50 条序列，  
137 采用 FASTA 方式一次性将所需序列导出备用（具体操作步骤详见图 3）。

- 138 1) 打开网站 <https://www.ezbiocloud.net/>，选择“16S-based ID”，打开页面后点  
139 击“Identify new sequence”
- 140 2) 在相应的位置输入序列信息，然后点击“Next”进行比对
- 141 3) 所得比对结果可以查看菌株的分类地位，最相似菌株，序列完整性等信息。

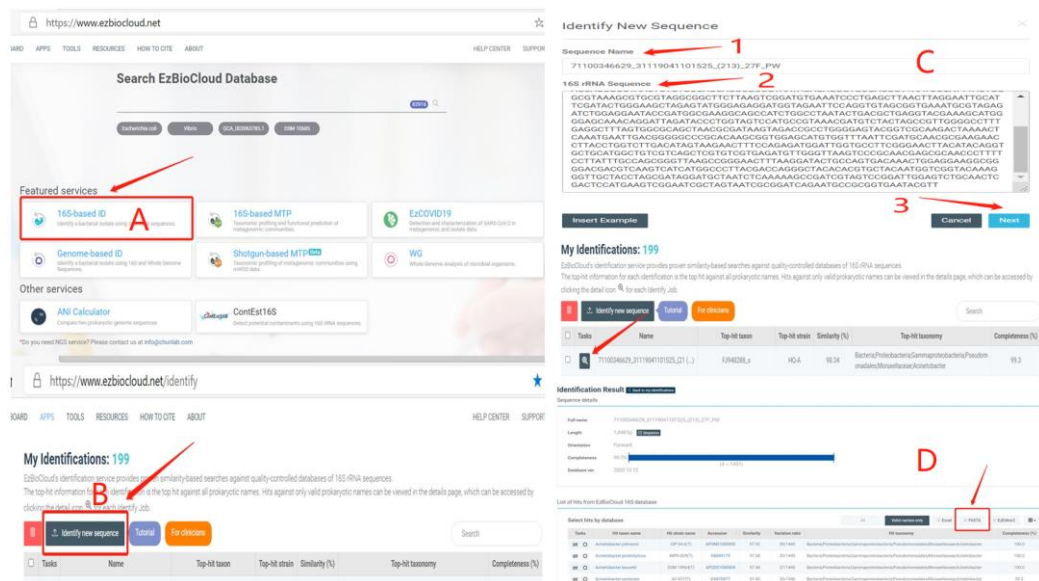


图 3. EzBioCloud 数据库 16S rRNA 基因相似性比对方法

7.4 再次打开 MEGA，点击“File”选项并选择“Open a File”，打开上一步在 EzBioCloud 下载的 FASTA 文件进行系统发育树的构建

- 1) 打开序列时选择“Align”，打开后点击“W”图标，进一步选择“Align DNA”进行序列比对（详细操作步骤见图 4）；
- 2) 直接点击“OK”进入下一步，比对完成后删除序列前端长度不一致的序列，保留带有“\*”部分的序列，依次点击“Data”和“Save as”或者直接点击键盘“Ctrl+S”键，将其保存为 maxn 格式的文件(详细操作步骤见图 5)；

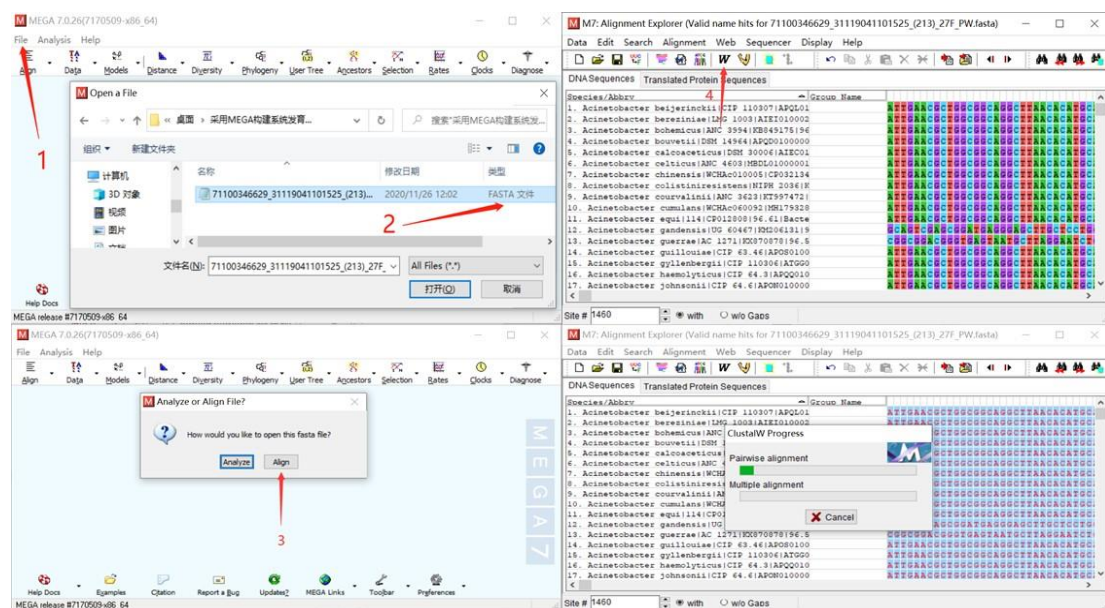


图 4. 用 MEGA 软件进行多重比对的方法

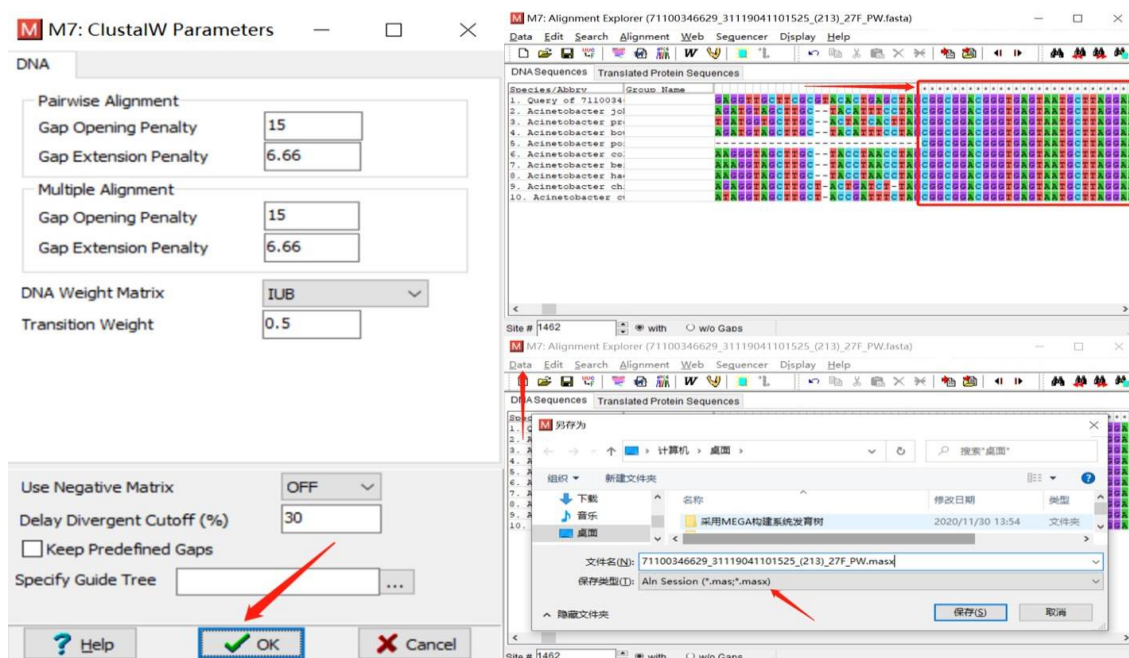


图 5. 用 MEGA 软件比对多重序列并选取有效长度

- 3) 回到 MEGA 主页，点击“Phlogeny”并选择“N-J”树进行系统发育树的构建，在对话框中打开上一步保存的 MASX 格式文件，设定并保存相应参数，注意 Bootstrap 重复次数为 1000 次，点击“Compute”运行软件(详细操作步骤见图 6)；

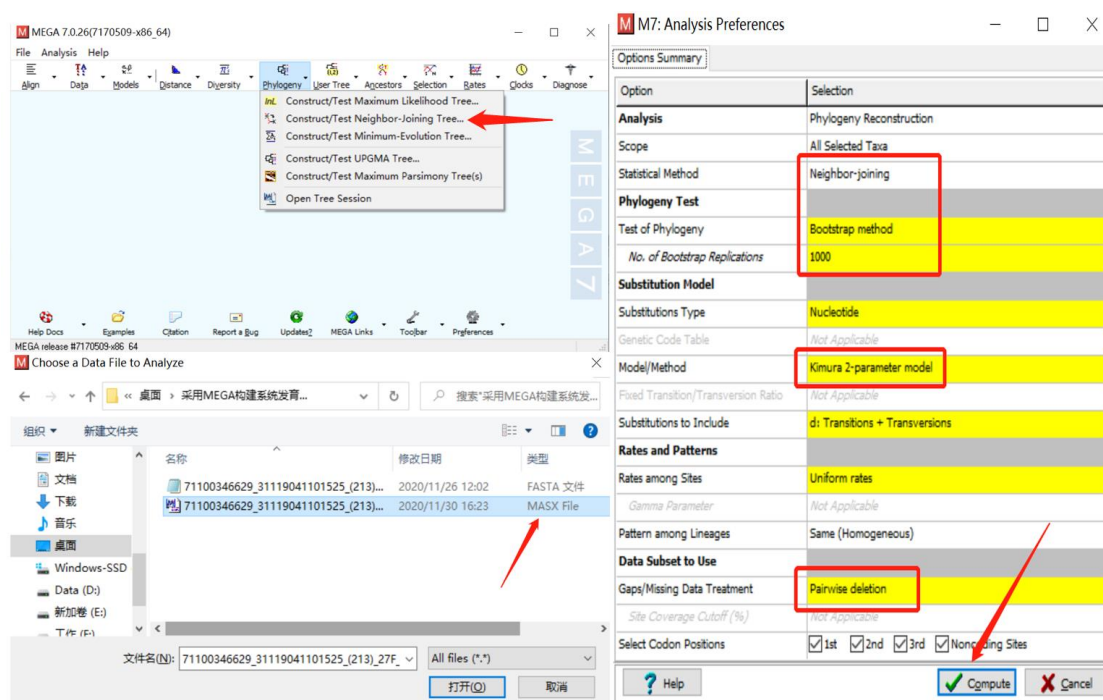


图 6. 构建 N-J 系统发育树



- 4) 软件运行完成后直接生成系统发育树,此时可将系统树“Copy to Clipboard”并粘贴到 PPT 中进行编辑,也可点击“File”直接保存为 PDF 格式文件(详细操作步骤见图 7)。

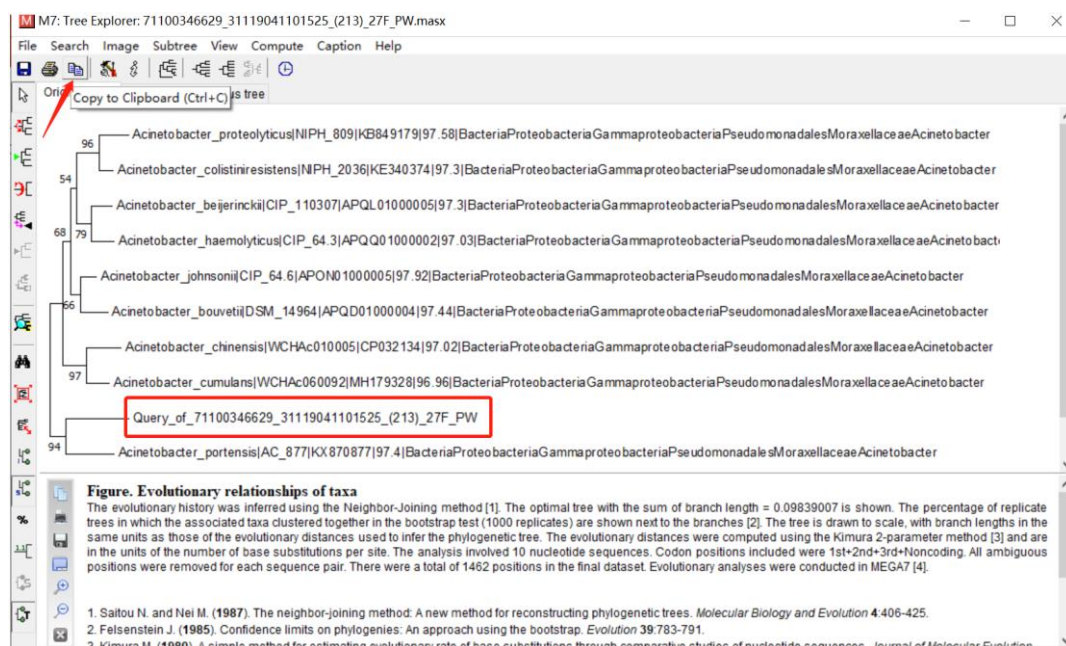


图 7. 系统发育树的读取和保存

## 8. 菌株保藏

实验所获得的菌株,需要对其形态特征,培养特征,分离条件,基因序列,系统分类学地位等进行详细归纳和统计,最终将具有完整信息的菌株保藏在 20 %甘油管(含 5 %的 NaCl) 或 20 %的牛奶管(含 5 %的 NaCl),置于-80 ℃ 对进行长期保藏。

### 8.1 甘油管制作流程及菌株保藏方法

- 1) 提前准备好生长至对数期的活菌平板,确保菌株的 16S rRNA 基因序列验证正确无误,确保菌株无霉菌或杂菌污染,有单菌落为宜;
- 2) 提前准备好冻存管,甘油,超纯水,接种针等备用;
- 3) 量取 100 mL 超纯水,加入 20 mL 甘油并充分溶解,再加入 5 g NaCl 后再次溶解;
- 4) 将备好的甘油 NaCl 溶液分装于冻存管中,每管加入 1-1.5 mL 即可,121 ℃ 灭菌 30 min,备用;

5) 用接种针挑取适量菌体于甘油管中，混匀，甘油管外壁贴好标签备注菌株信息；

6) 接种完成的甘油管置于-20 ℃ 或-80 ℃ 进行保存。

## 8.2 以牛奶为保护剂的冷干管制作流程及菌株保藏方法

1) 提前准备好生长至对数期的活菌平板，确保菌株的 16S rRNA 基因序列验证正确无误，确保菌株无霉菌或杂菌污染，有单菌落为宜；

2) 提前准备好安瓿瓶，脱脂棉，牙签，脱脂牛奶，超纯水，接种针等备用；

3) 将 100 mL 超纯水加热至 40 ℃ 左右，加入 40 g 脱脂奶粉，搅拌均匀，使之充分溶解，确保无块状物存在。将制备好的牛奶溶液分装于安瓿管中，每管装 0.5 mL，用棉塞封好待灭菌；

4) 量取 100 mL 超纯水，加入 10 g NaCl 并充分溶解，待灭菌；

5) 备好的 NaCl 溶液于 121 ℃ 灭菌 30 min 备用，脱脂牛奶于 115 ℃ 灭菌 10 min，灭菌完后迅速拿出，防止脱脂牛奶变黄；

6) 将灭好菌的 NaCl 溶液在超净工作台中与牛奶管中的牛奶按照 1: 1 混合，即每管加入 0.5 mL 的 NaCl 溶液，最终制备成 20 % 的牛奶管 (NaCl 的含量为 5 %) ；

7) 用接种针从平板上挑取适量菌体于牛奶管中，混匀，牛奶管外壁贴好标签备注菌株信息；

8) 接种好菌体的牛奶管尽快进行冻干处理，若不能及时冻干，确保其保藏在 -80 ℃；

9) 冷冻干燥约 24 h，取出，用酒精喷灯熔封，至此完成菌株牛奶管保藏的全过程。

## 结果与分析

1) 比较每种培养基或不同处理之间菌株的分离频率和多样性等；

2) 统计不同培养基和不同实验处理下，潜在新分类单元的种类和数量；

3) 记录和比较不同环境来源的样品中功能菌株和稀有类群的分布情况；

4) 对所得结果进行 excel 表格信息汇总，必要时绘制堆积柱形图或饼图等；

5) 同一样品的分离结果可与其相应的免培养分析结果进行比较。

## 213 注意事项

## 214 后续实验参考

- 215 1) 特定功能菌株筛选，如纤维素降解功能，产酶活性，溶磷，硝酸盐还原等；
- 216 2) 新分类单元的多相分类实验，当菌株与现有物种的相似性小于 98.55 % 时，可进
- 217 一步开展分类学实验；
- 218 3) 特定类群的代谢产物分析，如放线菌产抗生素研究，产胞外多糖和产 PHAs（聚
- 219 羟基脂肪酸类）等。

## 221 方法二：嗜盐放线菌分离保藏方法

223 **摘要：**嗜盐放线菌作为极端生命形式的一部分，具有独特的生理特性且代谢产物多样，  
224 在抗生素、酶制剂、生物技术等方面具有巨大的潜能。在实验室条件下分离培养盐湖环  
225 境中的嗜盐放线菌，深度了解盐湖放线菌的多样性，充分挖掘盐湖环境有用放线菌资源，  
226 评估其开发应用潜力，为今后的工业化利用奠定基础。

227 **关键词：**盐湖，分离，纯培养，放线菌，保藏

## 229 材料与试剂

- 230 1. 无机盐：NaCl，KCl，CaCl<sub>2</sub>，KNO<sub>3</sub>，CaCO<sub>3</sub>，FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，
- 231 MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O，MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O，ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O，丙酮酸钠，柠檬酸三钠等；
- 232 2. 碳源或氮源：可溶性淀粉，葡萄糖，甘油，精氨酸，酵母粉，蛋白胨，胰蛋白胨，
- 233 干酪素，纤维素，酸水解酪蛋白，藕粉，麦芽膏等；
- 234 3. 其它溶剂和试剂：琼脂，脱脂奶粉，甘油，水解酪素，制霉菌素，Chelex 等；
- 235 4. 实验用品和耗材：研钵，研磨棒，涂布棒，接种针，90 mm 的无菌培养皿，15 mL
- 236 无菌离心管，100 mL 锥形瓶，各种型号的移液器吸头（20 μL，200 μL，1000 μL），天
- 237 平，记号笔，酒精灯，酒精喷灯，安瓿瓶，2 mL 冻存管，电磁炉等。

## 239 仪器设备

240 同方法一

## 软件和数据库

同方法一

## 实验步骤

### 1. 试验前准备

同方法一

### 2. 分离培养基的配置

首先根据样品数量和试验重复计算所需培养基的用量，然后根据配方称取和配制适量的培养基，调至合适 pH，高温灭菌后，待培养基冷却至 50 ℃ 左右倒板备用。

注：每种培养基在配置过程中，可根据样品本身的特性和实验需要，设置不同盐梯度，如 5%、10%、15%、20% 和 25% 等，以此添加不同质量的 NaCl 或者 KCl，NaCl 和 MgCl<sub>2</sub> 等复合盐。涂板时每个处理做 2 个重复。

培养基配方参考如下 (g/L)：

2.1 放线菌 ISP5 培养基(Gottlieb and Shirling,1966)：酵母粉 5 g，甘油 10 g，L-天门冬酰胺 1 g，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g，KNO<sub>3</sub> 5 g，MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 50 g，微量盐 1 mL，琼脂粉 12 g，加入蒸馏水定容至 1000 mL，pH 7.2–7.4。微量盐配方：FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.2 g，MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O 0.1 g，ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.1 g，蒸馏水 100 mL。

2.2 放线菌淀粉酪素培养基(沈硕，2017)：淀粉 10 g，水解酪素 0.3 g，KNO<sub>3</sub> 2 g，MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05 g，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g，CaCO<sub>3</sub> 0.02 g，FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 10 mg，NaCl 50 g，琼脂粉 12 g，加入蒸馏水定容至 1000 mL，pH 7.2–7.4。

2.3 放线菌改良淀粉酪素培养基(沈硕，2017)：葡萄糖 10 g，水解酪素 0.3 g，KNO<sub>3</sub> 2 g，MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05 g，K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g，CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 1 g，FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 10 mg，NaCl 50 g，琼脂粉 12 g，加入蒸馏水至定容 1000 mL，pH 7.2–7.4。

2.4 CM 改良培养基(沈硕，2017)：水解酪素 7.5 g，酵母粉 10 g，柠檬酸三钠 3 g，MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 20 g，KCl 2 g，FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05 g，NaCl 30 g，琼脂粉 12 g，加入蒸馏水定容至 1000 mL，pH 7.2–7.4。

2.5 CCMS 培养基(田蕾等，2017)：纤维素 10 g，干酪素 0.3g，KNO<sub>3</sub> 0.2 g，MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05 g，CaCO<sub>3</sub> 0.02 g，FeSO<sub>4</sub> 0.01 g，KCl 20 g，MgCl<sub>2</sub> 30 g，NaCl 50/100/150 g，琼脂糖 15 g，pH 7.5。



2.6 甘油精氨酸培养基(夏占峰, 2011): 甘油 5g, 精氨酸 0.5g, 葡萄糖 1g,  $K_2HPO_4$  0.3g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  5g, 维生素母液 0.5mg, 微量盐溶液 1 mg, 琼脂 20 g, 加入蒸馏水定容至 1000 mL, 121 °C 高压灭菌 30 min。

2.7 放线菌 ISP2 培养基(Gottlieb and Shirling,1966) : 酵母粉 4 g, 葡萄糖 4 g, 麦芽膏 10 g, 微量盐溶液 1 mL, 琼脂 20 g, pH 7.2-7.4。

2.8 改良高氏一号培养基: 可溶性淀粉 (Soluble starch) 20 g,  $KNO_3$  1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g, Agar 12 g, 微量盐 1 mL。

### 3. 样品预处理

对于嗜盐放线菌的分离, 一般需要先要将样品提前进行干燥处理。

3.1 将采回的样品置于带有无菌滤纸的培养皿中, 于超净工作台风干

3.2 称取 5 g 干燥后的样品, 倒入装有 45 mL 无菌超纯水 (含有 10% 的无菌 NaCl, 提前装好玻璃珠) 的三角瓶, 震荡混匀, 然后用三种方法进行预处理:

1) 放入 80 °C 烘箱中处理 20 min

2) 置于 120W, 2450 MHz 微波条件下处理 3 min, 28 °C 震荡 20 min

3) 经紫外灯 (100W) 垂直照射 10 min

*注: 以上处理方法依据个人实验目的进行选择, 也可不进行高温, 微波或紫外处理, 直接在摇床震荡培养 30 min 即可。*

### 4. 样品稀释及涂布

4.1 将经过预处理的样品进一步稀释成浓度为  $10^{-3}$  或  $10^{-4}$  的悬浊液;

4.2 依次将每个样品, 每个浓度下的悬浊液 100  $\mu$ L 涂布于分离培养基;

4.3 涂布后的平板置于黑暗条件下于 37 °C 倒置培养 1-2 周, 观察并记录生长情况。

### 5. 菌株分离纯化

待分离培养皿上的单菌落长到合适的丰度时, 可开始下一步的纯化。依据菌落形态(形状、大小、颜色及表面特征), 挑取单菌落进行纯化。先用记号笔在培养皿的底部标记好待纯化的菌株, 并将其按顺序编号。尽量全面挑取不同形态、颜色、大小的菌落以避免重复。挑选完成后, 在超净工作台中利用接种针挑取单菌落到纯化板上, 采用三区划线法进行纯化。菌株纯化过程中, 需要对每株菌做好标记并进行不同编号处理。当菌株在培养基中获得形态一致的单一菌落时即获得微生物纯培养物。

## 6. 菌株 16S rRNA 基因鉴定

同方法一

## 7. 菌株系统发育学分析

同方法一

## 8. 菌株保藏

同方法一

## 方法三：嗜盐古菌分离培养及保藏方法

**摘要：**嗜盐古菌作为重要的微生物组成部分，参与盐湖生境的生态形成及变化，具有重要的生态功能。嗜盐古菌能利用特殊的胞外及胞内酶（如：淀粉酶、纤维素酶、木聚糖酶、几丁质酶、果胶酶、脂肪酶、酯酶、蛋白酶等）通过水解有机质参与到碳/氮循环中，许多嗜盐古菌具有生物解磷作用。针对不同环境，改进可培养方法在实现不可培养微生物的可培养化、增加稀有及新分类单元的检出率方面，起着重要作用。在实验室条件下分离培养盐湖环境中的嗜盐古菌，深度了解盐湖嗜盐古菌的多样性，充分挖掘盐湖环境有用嗜盐古菌资源，评估其开发应用潜力，为今后的工业化利用奠定基础。

**关键词：**盐湖，分离，纯培养，古菌，保藏

## 材料与试剂

1. 无机盐：NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, NH<sub>4</sub>Cl, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 丙酮酸钠，柠檬酸三钠等；
2. 碳源或氮源：可溶性淀粉，葡萄糖，甘油，酵母粉，蛋白胨，鱼蛋白胨，干酪素，纤维素，酪蛋白水解氨基酸，藕粉，麦芽膏，微晶纤维素，谷氨酸钠等；
3. 其它溶剂和试剂：琼脂，脱脂奶粉，甘油，干酪素，水解酪素，Chelex，等；
4. 实验用品和耗材：研钵，研磨棒，涂布棒，接种针，90 mm 的无菌培养皿，15 mL 无菌离心管，100 mL 锥形瓶，各种型号的移液器吸头（20 μL, 200 μL, 1000 μL），天平，记号笔，酒精灯，安瓿瓶，2 mL 冻存管，电磁炉等。

## 仪器设备

同方法一

## 软件和数据库

MEGA 7.0 (<https://www.megasoftware.net/>)

EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>)

CLUSTAL-X1.8 (<http://www.clustal.org/>)

## 实验步骤

### 1. 样品预处理

采用自然风干法对样品进行预处理，准备内置三层滤纸的无菌培养皿，将样品至于培养皿中，自然风干样品 3-5 d。对于水样样品可直接利用水样进行稀释，同时在培养基设计上可利用水样直接代替培养基的蒸馏水 (Burns *et al.*, 2004)。

### 2. 培养基选择及配置

#### 2.1 常规分离培养基

1) 高氏培养基 (Liu *et al.*, 2013) : 可溶性淀粉 20 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, NaCl 150 or 200 g, 微量盐 (2% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1% MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 1% ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1% CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O) 1 mL, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2

2) NOM/NHM 分离培养基 (Cui *et al.*, 2012) (Han and Cui, 2014): 酵母粉 0.05 g, 鱼蛋白胨 0.25 g, 丙酮酸钠 1.0 g, KCl 5.4 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g, CaCl<sub>2</sub> 0.29 g, NH<sub>4</sub>Cl 0.27 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 26.8 g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 23.0 g, NaCl 184 g, 微量盐 1 mL, 琼脂 18.0 g/L, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0-7.5

3) CM 培养基 (Asker and Ohta, 1999) : 酵母粉 10 g, 酪蛋白水解物 7.5 g, NaCl 250 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 40 g, KCl 2 g, 柠檬酸三钠 3 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2

4) HM (Halophile medium) 培养基: 酵母粉 5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 20 g, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 0.1 g, NaCl 180 g, 琼脂 18.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2

#### 2.2 改良及其它培养基

1) 改良高氏培养基 (Liu *et al.*, 2019) : 可溶性淀粉 5 g, 藕粉 5 g, KNO<sub>3</sub> 1 g,

- 357 MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, NaCl 150 or 200 g, 微量盐 (2%  
358 FeSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O, 1% MnCl<sub>2</sub> ·4H<sub>2</sub>O, 1% ZnSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O, 1% CuSO<sub>4</sub> ·5H<sub>2</sub>O) 1 mL, 蒸  
359 馏水 1000 mL, pH 7.2
- 360 2) 改良 T<sub>3</sub> 培养基 (Liu *et al.*, 2014) (Tang *et al.*, 2008) : 微晶纤维素 10 g, 干酪  
361 素 0.3 g, KNO<sub>3</sub> 2 g, MgCl<sub>2</sub> ·6H<sub>2</sub>O 30 g, KCl 20 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ·3H<sub>2</sub>O 0.2 g, CaCO<sub>3</sub>  
362 0.02 g, MgCl<sub>2</sub> ·6H<sub>2</sub>O 3 g, NaCl 200 g, 微量盐 1 mL, 琼脂 18.0 g/L, 蒸馏水  
363 1000 mL, pH 7.2
- 364 3) 改良 R<sub>2</sub>A 培养基: 酵母粉 0.5 g, 可溶性淀粉 0.5 g, 蛋白胨 0.5 g, 葡萄糖  
365 0.5 g, 丙酮酸钠 0.3 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 g, NaCl 200 g, MgSO<sub>4</sub> 0.024 g, 琼脂 18 g,  
366 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2
- 367 4) C 培养基: 酵母粉 1.0 g, 酪蛋白水解物 1.0 g, 谷氨酸钠 0.5 g, KCl 1.0  
368 g, 柠檬酸三钠 1.5 g, MgSO<sub>4</sub> ·7H<sub>2</sub>O 5.0 g, NaCl 180 g, 琼脂 18.0 g, 蒸馏  
369 水 1000 mL, pH 7.2

370 注: 培养基盐浓度可以设置盐浓度梯度 (Elshahed *et al.*, 2004) 或者结合样品理化信  
371 息设计寡营养培养基进行分离。

### 372 3. 分离方法

#### 373 3.1 梯度稀释法

374 取处理后的样品 5 g, 放入含有 50 mL 15 % NaCl 的三角瓶内, 制作 10<sup>-1</sup> 菌悬液,  
375 放入摇床内 37 °C 下活化 24 h。采用梯度稀释至终浓度为 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup> 或 10<sup>-4</sup>, 取 100  
376 μL 均匀涂布于分离培养基上。对于稀有类群可选择氮源寡营养培养基, 如: 5 μ  
377 M 氨基酸 + 5 μM 丙酮酸 (Medium A); 5 μM 氨基酸+ 5 μM 丙酮酸+ 5 μM 醋  
378 酸 (Medium B); 50 μM 氨基酸+ 0.5 % (wt/vol) 丙酮酸(Medium C); and 50 μM 氨  
379 基酸+ 50 μM p 丙酮酸+ 50 μM 醋酸(Medium D) , 选择 10<sup>-6</sup>-10<sup>-10</sup> 进行稀释分离  
380 (Burns *et al.*, 2004) 。

#### 381 3.2 直接涂布法

382 将风干样品进行撵磨, 选用无菌棉棒蘸取少许样品, 采用三线或者四线法接种  
383 于分离培养基上。挑选最后一笔的单一菌落进行纯化。

#### 384 3.3 培养条件

385 通常情况下 37 °C 黑暗条件下培养 3 周以上, 或者设置不同培养温度进行培养。



#### 4. 16S rRNA 基因测序

纯化菌株采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行基因组提取，选用 P<sub>1</sub>：5'-ATTCCGGTTGATCCTGCCGGA-3'，P<sub>2</sub>：5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCAG-3' (王振雄 *et al.*, 2000)、0018F：5'-ATTCCGGTTGATCCTGCC-3'，1518R：5'-AGGAGGTGATCCAGCCGC--3' (Cui *et al.*, 2009)、D30：5'-ATTCCGGTTGATCCTGC-3'，D56：5'-GYTACCTTGTTACGAC-3' (Menasria *et al.*, 2018) 等引物进行嗜盐古菌 16S rRNA 基因扩增。送广州擎科生物公司进行基因测序分析。通过 EzBioCloud 进行 16S rRNA 基因序列比对，分析纯培养嗜盐古菌分类地位。对于 16S rRNA 基因序列对比相似度小于 98.5 % 的菌株，作为潜在新种分类单元；相似度小于 96 % 的菌株，作为潜在新属分类单元。从 NCBI 数据库下载相近序列，采用 CLUSTAL-X1.8 进行序列比对，利用 MEGA 7.0 构建 N-J (Neighbour joining) 系统进化树。

#### 5. 菌株保藏

采用含 5 % NaCl 的 20 % 牛奶，或含有 15 % NaCl 的 30 % 甘油对菌株进行保藏；牛奶管于 4 ℃、甘油管于 -80 ℃ 保存。完善菌株信息 (采样地点地理信息、样品理化信息、菌株分离条件信息、菌株形态照片采集及菌株 16S rRNA 比对信息等)，科学构建嗜盐古菌资源库。

#### 参考文献

1. Asker, D. and Ohta, Y. (1999). Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(6): 617-621. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)87089-9](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)87089-9)
2. Burns, D. G., Camakaris, H. M., Janssen, P. H. and Dyll-Smith, M. L. (2004). Cultivation of Walsby's square haloarchaeon. *Fems Microbiology Letters* 238(2): 469-473. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.016>
3. Cui, H. L., Yang, X., Zhou, Y. G., Liu, H. C., Zhou, P. J. and Dyll-Smith, M. L. (2012). Halobellus limi sp nov and Halobellus salinus sp nov., isolated from two marine solar salterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 1307-1313. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032169-0>
4. Cui, H. L., Zhou, P. J., Oren, A. and Liu, S. J. (2009). Intraspecific polymorphism of 16S rRNA genes in two halophilic archaeal genera, Haloarcula and Halomicrobium. *Extremophiles* 13(1): 31-37. <https://doi.org/10.1007/s00792-008-0194-2>
5. Elshahed, M. S., Najar, F. Z., Roe, B. A., Oren, A., Dewers, T. A. and Krumholz, L. R. (2004). Survey of archaeal diversity reveals an abundance of halophilic Archaea in a

- low-salt, sulfide- and sulfur-rich spring. *Applied and Environmental Microbiology* 70(4): 2230-2239. <https://doi.org/10.1128/Aem.70.4.2230-2239.2004>
6. Han, D. and Cui, H. L. (2014). Halobacterium rubrum sp. nov., isolated from a marine solar saltern. *Archives of Microbiology* 196(12): 847-851. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-1023-x>
7. Gottlieb, D., Shirling, E. B. (1966) Methods for characterization of Streptomyces species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 16(3):313-340. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>
8. Liu, B. B., Rao, M. P. N., Yin, X. Q., Li, X., Salam, N., Zhang, Y., Alkhalifah, D. H. M., Hozzein, W. N. and Li, W. J. (2019). Description of Halegenticoccus soli gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a soil sample of Ebi lake. *Extremophiles* 23(5): 521-528. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01104-9>
9. Liu, B. B., Tang, S. K., Cui, H. L., Zhang, Y. G., Li, L., Zhang, Y. M., Zhang, L. L. and Li, W. J. (2013). Halopelagius fulvigenes sp nov., a halophilic archaeon isolated from a lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 2192-2196. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045773-0>
10. Liu, B. B., Zhao, W. Y., Chu, X., Hozzein, W. N., Prabhu, D. M., Wadaan, M. A. M., Tang, S. K., Zhang, L. L. and Li, W. J. (2014). Haladaptatus pallidirubidus sp nov., a halophilic archaeon isolated from saline soil samples in Yunnan and Xinjiang, China. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 106(5): 901-910. <https://doi.org/10.1007/s10482-014-0259-4>
11. Menasria, T., Aguilera, M., Hocine, H., Benammar, L., Ayachi, A., Bachir, A. S., Dekak, A. and Monteoliva-Sanchez, M. (2018). Diversity and bioprospecting of extremely halophilic archaea isolated from Algerian arid and semi-arid wetland ecosystems for halophilic-active hydrolytic enzymes. *Microbiological Research* 207: 289-298. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.12.011>
12. Tang, S. K., Tian, X. P., Zhi, X. Y., Cai, M., Wu, J. Y., Yang, L. L., Xu, L. H. and Li, W. J. (2008). Haloactinospira alba gen. nov., sp. nov., a halophilic filamentous actinomycete of the family Nocardiopsaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 58(Pt 9): 2075-2080. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65531-0>
13. 顾晓颖, 李冠 and 生物技术, 吴. J. (2007). 巴里坤湖和玛纳斯湖嗜盐菌的分离及功能酶的筛选. 017(003): 26-30
14. 沈硕 (2017). 青藏高原察尔汗盐湖地区可培养中度嗜盐菌的群落结构与多样性. *微生物学报* 57(004): 490-499
15. 田蕾, 李恩源, 关统伟, 唐蜀昆, 刘晓飞 and 张小平 (2017). 艾丁湖可培养嗜盐菌多样性及功能酶\_抗菌活性筛选. *微生物学通报* 11: 2575-2587. <https://doi.org/10.13344/j.microbiol.china.170046>
16. 王振雄, 徐毅 and 周培瑾 (2000). 嗜盐碱古生菌新种的系统分类学研究. 40(2): 115-120. <https://doi.org/10.13343/j.cnki>
17. 夏占峰, 关统伟, 阮继生, 黄英 and 微生物学报, 张. J. (2011). 艾丁湖沉积物放线菌多样性. 51(8)
18. 赵婉雨 (2013). 柴达木盆地达布逊盐湖微生物多样性研究, 中国地质大学 (北京).

