常见盐渍食品中嗜盐微生物分布及其胞外酶活

张申奥， 陈飞龙， 陈 博， 苏亦鸣， 陈绍兴*
（安徽师范大学 生命科学学院，安徽 芜湖 241000）

摘要：嗜盐微生物多生活在高盐环境中，在盐腌制品、盐渍食品、海产品等高盐食品中含量丰富，是一种重要的极端环境微生物资源。作者对采自安徽芜湖超市的7种常见高盐食品进行嗜盐微生物的纯培养分离，根据菌落形态特征差异，选取43株进行基于16S rRNA基因序列相似性的物种鉴定。确定分类地位后，分别挑取不同种代表菌株进行产胞外酶活测定。最终作者确定该43株嗜盐微生物中包含13属21种嗜盐微生物，其中嗜盐古菌4属7种，嗜盐细菌9属14种。分离到产胞外淀粉酶菌株3株，产酯酶7株，产明胶酶1株，产触酶8株，说明市售高盐食品中普遍存在嗜盐微生物；这些嗜盐微生物所产的具有强耐高盐活性的胞外酶具有较高的生物开发利用价值。

关键词：高盐食品；嗜盐微生物；淀粉酶；酯酶；明胶酶；触酶
中图分类号：Q 93　**文章编号：**1673-1689(2023)08-0038-08　DOI：10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.08.005

Distribution of Halophilic Microorganisms in Commercial Salted-Foods and Production of Extracellular Enzymes

ZHANG Shen'ao, *CHEN Feilong*, *CHEN Bo*, *SU Yiming*, *CHEN Shaoxing**
(College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China)

Abstract: Halophilic microorganisms live in hypersaline environments, *i.e.* salted products, seafood and other high-salt foods. Salted-food is an important hypersaline environment rich in extremophiles. the authors collected 7 kinds of salted-foods collected from supermarkets in Wuhu, Anhui Province were used to isolate the halophilic microorganisms. According to the difference incolony morphology, 43 strains were selected for further identification based on the similarity of 16S rRNA gene sequence. After determination their classification status, representative strains from different species were selected for the detection of extracellular enzyme activities. Finally, it was determined that the 43 halophilic microorganisms contained 21 species in 13 genera in domains bacteria and archaea. There are 7 species in 4 genera belonging to halophilic archaea, while 14 species in 9 genera belonging to halophilic bacteria. This study isolated 3 strains produce extracellular amylase, 7 strains produce esterase, 1 strain produces gelatinase, and 8 strains produce catalase, which indicates that halophilic microorganisms are prevalent in the salted-food in the market. Extracellular enzymes produced by these halophilic microorganisms with strong salt-tolerance activity have potential

收稿日期：2021-08-16
基金项目：国家自然科学基金项目(31460003)；安徽师范大学大学生创新创业训练计划项目(202110370075)。
* **通信作者：**陈绍兴(1979—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事极端微生物资源的开发与利用研究。E-mail：chensx@ahnu.edu.cn

applications in the biological industry.
Keywords: salted-food, hypersaline environments, halophilic microorganisms, amylase, esterase, gelatinase

嗜盐微生物生活于高盐环境中,如盐湖、盐矿、海洋晒盐地、盐碱土壤以及海产品和一些盐渍食品,属于极端环境微生物的一种[1]。它们中有些类群能合成生物可降解塑料,在生物医学和环境治理等领域具有广泛应用前景[2-5]。盐渍食品是由新鲜蔬菜、瓜果、肉制品等经腌制、发酵制成的风味食品。嗜盐菌在发酵过程中起到促进作用。目前,已在多种腌制、盐渍食品或海产品等高盐食品中分离鉴定出嗜盐菌。2010 年,陈学云等在盐干带鱼中鉴定了多种耐盐的葡萄球菌(*Staphylococcus*)[6];同年,王宇等在腌制咸鱼中分离到了一株中度嗜盐菌,鉴定结果表明该菌隶属于 *Halobacillus* 属[7];2011 年,孙业盈等在蜢子虾酱中分离纯化鉴定了一株中度嗜盐菌,定为盐脱氮枝芽孢杆菌(*Virgibacillus halodenitrificans*)[8];2012 年,吕彦等从蟹酱中分离出了一株中度嗜盐菌,系统发育分析将 3 株嗜盐菌鉴定为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)中的 3 个不同的种,分别为琥珀葡萄球菌(*Staphylococcus succinus*)、科氏葡萄球菌(*Staphylococcus cohnii*)和马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)[9]。

高盐食品中存在着大量的嗜盐菌,嗜盐菌的大量繁殖,可能会引发食品安全问题。20 世纪 90 年代,曾发生过嗜盐菌污染食物导致中毒的事件。因此对盐渍食品中的嗜盐菌的分离鉴定研究,是评价食品的安全性和防止嗜盐菌污染食品的前期基础[10]。另外,嗜盐古菌是一类生活于极端高盐环境的化能异养型原核微生物,其所分泌的胞外酶(外泌酶)具有在高盐条件下仍能保持活性的特点,在制革工业、高盐有机废水处理和泡菜加工等腌制食品方面有重要用途[11]。嗜盐微生物分泌的蛋白酶、肽酶、碱性磷酸酶等不仅能够促进原料底物进行分解及生物转化,显著缩短发酵周期,还能将肽和寡肽转化为前体氨基酸从而形成海鲜调味品特有的风味物质,有利于海鲜调味品鲜美醇香气味的形成[12]。例如,目前高盐腌制食品生产的一个主要问题是发酵时间长。有研究发现 *Halobacterium* sp. SP1 的添加能加速鱼露的发酵过程[13],研究表明其分泌的胞外蛋白酶发挥了关键的作用,经蛋白酶作用产生的多肽和氨基酸不仅赋予了鱼露丰富的营养价值,同时对鱼露的风味和香气也有着重要的提升[13]。另外,嗜盐古菌胞外蛋白酶、淀粉酶和酯酶分别在肽合成、调味剂和食品腌制、多不饱和脂肪酸生产等方面具有较广泛的应用价值[14]。

作者从市场中常见的高盐食品中分离鉴定嗜盐菌,并对其多样性及相关胞外酶活性进行研究,以期为高盐食品中嗜盐菌的群落结构以及高盐食品安全评价提供帮助。挖掘高盐食品中的嗜盐微生物资源,以期找到高产胞外酶的嗜盐菌株,为极端环境微生物资源的开发和利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

7 种高盐食品:海蜒、虾皮、海带、什锦菜、酱油蜜瓜、宝塔菜和辣酱(图 1),均购于安徽省芜湖市大润发超市。其中海蜒产自浙江宁波,虾皮产自江苏扬州,海带产自山东威海,什锦菜产自江苏南京,酱油蜜瓜产自江苏南京,宝塔菜产自江苏南京,辣酱产自安徽芜湖。

1.2 嗜盐微生物的分离与纯化

1.2.1 培养基制备 分离高盐食品中嗜盐微生物的培养基为 AS-168 培养基和 NOM 培养基。AS-168 培养基(组分 g/L):酸水解酪蛋白氨基酸 5.0,酵母粉 5.0,谷氨酸单钠 1.8,柠檬酸钠 3.0,$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 20.0,KCl 2.0,NaCl 200.0,$FeCl_2\cdot 4H_2O$ 0.036,$MnCl_2\cdot 4H_2O$ 0.0036;NOM 培养基(组分 g/L):酵母粉 0.05,鱼蛋白胨 0.25,丙酮酸钠 1.0,KCl 5.4,$CaCl_2$ 0.29,NH_4Cl 0.27,$MgSO_4\cdot 7H_2O$ 26.8,$MgCl_2\cdot 6H_2O$ 23,NaCl 184。pH 调至 7.5,1×10^5 Pa 灭菌 20 min。配制固体培养基时,在灭菌前每升加入琼脂粉 15.0 g。

1.2.2 菌株的分离与纯化 于超净台中收集海带表面白色盐霜于无菌试管中,加入 5 mL 质量分数

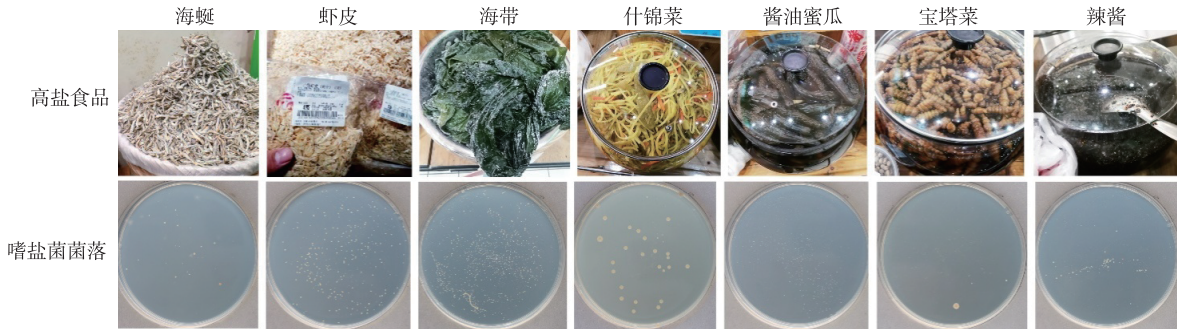


图 1　不同高盐食品和嗜盐微生物的分离

Fig. 1　Salted-foods and culture-dependent isolation

20% 的 NaCl 溶液悬浮,在漩涡振荡仪中混合5 min。吸取 1 mL 混合液于 1.5 mL EP 管中，并以此为原液,按照 10^{-1}、10^{-2} 和 10^{-3} 进行多梯度稀释。分别吸取 200 μL 液体涂布于 NOM(或者 AS-168)培养基,随后放入培养箱,37 ℃倒置培养。对于海蜒和虾皮,超净台中取 1 g 样品于无菌研钵中碾成粉末，加入 5 mL 灭过菌的质量分数 20% NaCl 溶液悬浮。后续操作同海带。对于辣酱、宝塔菜、什锦菜、酱油蜜瓜,直接吸取其盐腌水(辣酱为油液)作为原液,其余操作同海带。培养 10 d 后,挑取每个培养基上长出的不同类型的单菌落至新的固体培养基上划线,继续培养。7 d 后,再次进行平板划线分离进行菌株的进一步纯化。

1.3　基于 16S rRNA 基因的初步分子鉴定

1.3.1　菌株 PCR 扩增模板 DNA 的提取　水裂解法(适用于纯水裂解型嗜盐古菌)：挑取适量的菌体,悬入含有 50 μL 灭菌的蒸馏水的离心管中。使用漩涡振荡仪充分振荡混匀,12 000 r/min 离心 3 min。收集上清液作为嗜盐古菌 PCR 扩增所需的模板 DNA。

酚-氯仿抽提法[15](适用于嗜盐细菌和纯水不裂解型嗜盐古菌):采用相同的方法制备菌悬液,再用酚氯仿溶液(苯酚:氯仿体积比 1:1,)抽提,12 000 r/min 离心 3 min;收集上清液,再用等体积的氯仿抽提,12 000 r/min 离心 3 min;收集上清液作为嗜盐细菌及纯水不裂解型嗜盐古菌 PCR 扩增所需的模板 DNA。

1.3.2　PCR 扩增 16S rRNA 基因　分别利用嗜盐古菌和嗜盐细菌的 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增。分别以 F8/R1462 和 27F/1492R 为嗜盐古菌和细菌的 16S rRNA 基因 PCR 扩增的引物[15]。将电泳检测成功的 PCR 产物送生物公司测序。

1.3.3　测序结果分析　获得各菌株 16S rRNA 基因的测序峰图,利用 BioEdit 软件[14]检查测序峰图的质量,去除两侧峰型较差的序列,选取中间可信度高的序列进行后续分析。将已选中的序列利用工具 EZbioCloud(https://www.ezbiocloud.net/)进行同源性搜索,得到与菌株亲缘关系最近的物种信息及其相似度,确定各个菌株的分类地位。将本研究所分离到的 43 株嗜盐菌的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank,获得序列登录号:MZ768566-MZ768608。

1.4　胞外酶活鉴定

根据文献对嗜盐菌的胞外淀粉酶、酯酶、明胶酶、触酶、蛋白酶、氧化酶进行酶活鉴定[15]。

2　结果与分析

2.1　7 种高盐食品中可培养嗜盐微生物的分布情况统计

2.1.1　7 种高盐食品中可培养嗜盐微生物物种分布情况　对经过纯培养分离并根据菌落的形态和颜色挑取 43 株进行 16S rRNA 基因测序和序列相似性分析。结果显示,从市售常见高盐食品中共分离出 21 种嗜盐微生物,分属 13 个属。如表 1 所示,其中嗜盐古菌分别来自 *Halorubrum*、*Haloarcula*、*Halobacterium*、*Halarchaeum* 这 4 个属的 7 个种;嗜盐细菌分别来自 *Halobacillus*、*Staphylococcus*、*Chromohalobacter*、*Gracilibacillus*、*Lentibacillus*、*Salinicoccus*、*Salimicrobium*、*Nesterenkonia*、*Alkalibacillus* 这 9 个属的 14 个种。

嗜盐古菌 4 个属分别隶属于 Halobacteria 纲,Haloferacales 和 Halobacteriales 目,Halorubraceae、Haloarculaceae 和 Halobacteriaceae 科。嗜盐细菌 9 个属分别隶属于 Bacillales、Oceanospirillale 和 Micrococcales 目;Bacillaceae、Staphylococcaceae、

表 1　21 种代表嗜盐微生物分类地位

Table 1　Taxonomic status of 21 representatives of halophilic microorganisms

菌株编号	分离源	所属物种	序列相似度/%	序列登录号
168-1	辣酱	*Staphylococcus nepalensis*	99.4	MZ768569
168-8	海带	*Chromohalobactercanadensis*	99.9	MZ768571
168-9	宝塔菜	*Gracilibacilluskimchii*	100.0	MZ768572
168-11	什锦菜	*Lentibacillusjuripiscarius*	97.3	MZ768573
168-13	海蜒	*Salinicoccussalsiraiae*	99.8	MZ768575
168-20	什锦菜	*Gracilibacillusbigeumensis*	99.4	MZ768578
N-2	辣酱	*Nesterenkoniahalophila*	99.4	MZ768593
N-6	辣酱	*HaloarculaHispanica*	97.6	MZ768580
N-8	辣酱	*Halorubrumhalophilum*	99.4	MZ768581
N-9	辣酱	*Halobacteriumjilantaiense*	100	MZ768582
N-11	辣酱	*Haloarculaquadrata*	99.4	MZ768583
N-13	辣酱	*Halobacteriumhubeiense*	99.9	MZ768584
N-14	辣酱	*Halarchaeumsalinum*	99.8	MZ768585
N-16	辣酱	*Salinicoccusamylolyticus*	99.1	MZ768594
N-18	虾皮	*Nesterenkoniahalobia*	98.3	MZ768595
N-23	虾皮	*Halobacteriumsalinarum*	100.0	MZ768587
N-28	酱油蜜瓜	*Lentibacillussalicampi*	99.6	MZ768600
N-29	海蜒	*Salimicrobiumsalexigens*	98.5	MZ768601
N-30	海蜒	*Halobacillusyeomjeoni*	98.7	MZ768602
N-34	海蜒	*Alkalibacillusalmallahensis*	99.8	MZ768604
N-37	宝塔菜	*Gracilibacillussaliphilus*	100.0	MZ768606

Halomonadaceae 和 Micrococcaceae 科。

2.1.2　7 种高盐食品中可培养嗜盐微生物优势物种分析　在 AS-168 培养基培养条件下，海蜒样品中的优势物种为 *Nesterenkonia* 属物种，占比 87.5%；虾皮样品中的优势物种为 *Salinicoccus* 属物种，占比 83.3%；海带样品中的优势物种为 *Haloarcula* 属物种，占比 88.2%；什锦菜样品中的优势物种为 *Lentibacillus* 属物种，占比 74.4%；辣酱样品中的优势物种为 *Staphylococcus* 属物种，占比 100.0%；宝塔菜样品中的优势物种为 *Gracilibacillus* 属物种，占比 40.0%，见图 2。

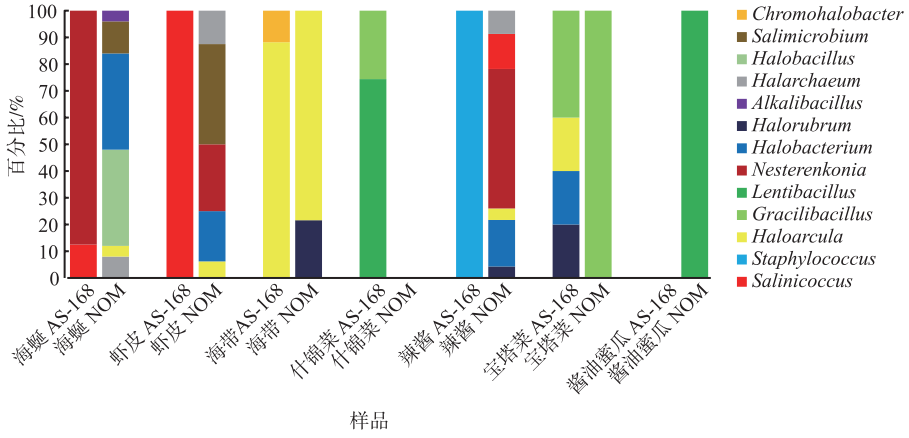


图 2　7 种高盐食品在 AS-168 和 NOM 培养基中可培养嗜盐微生物物种组成(属级水平)

Fig. 2　Species composition of halophilic microorganisms in AS-168 and NOM mediumsin 7 different salted-foods(genus level)

在 NOM 培养基培养条件下，海蜒样品中的优势物种为 *Halobacillus* 属和 *Halobacterium* 属物种，占比均为 36.0%；虾皮样品中的优势物种为 *Salimicrobium* 属物种，占比 31.2%；海带样品中的优势物种为 *Haloarcula* 属物种，占比 78.4%；辣酱样品中优势物种为 *Nesterenkonia* 属物种，占比 52.2%；宝塔菜样品中的优势物种为 *Gracilibacillus* 属物种，占比 100.0%；酱油蜜瓜样品中的优势物种为 *Lentibacillus* 属物种，占比 100.0%。

2.2 7 种高盐食品中可培养嗜盐微生物比较

2.2.1 不同样品中可培养嗜盐微生物物种组成比较 在 AS-168 培养基培养条件下，从海蜒样品中共分离出 2 个属的 2 种嗜盐微生物，均为嗜盐细菌；从虾皮样品中共分离出 1 个属的 2 种嗜盐微生物，均为嗜盐细菌；从海带样品中共分离出 2 个属的 2 种嗜盐微生物，其中嗜盐古菌 1 个属的 1 种，嗜盐细菌 1 个属的 1 种；从什锦菜样品中共分离出 2 个属的 2 种嗜盐微生物，均为嗜盐细菌；从辣酱样品中共分离出 1 个属的 1 种嗜盐微生物，均为嗜盐细菌；从宝塔菜样品中共分离出 4 个属的 5 种嗜盐微生物，其中嗜盐古菌 3 个属的 3 种，嗜盐细菌 1 个属的 2 种；从酱油蜜瓜样品中未分离出任何嗜盐微生物。

在 NOM 培养基培养条件下，从海蜒样品中共分离出 6 个属的 6 种嗜盐微生物，其中嗜盐古菌 4 个属的 4 种，嗜盐细菌 2 个属的 2 种；从虾皮样品中共分离出嗜盐微生物 5 个属的 5 种，其中嗜盐古菌 2 个属的 2 种，嗜盐细菌 2 个属的 2 种；从海带样品中共分离出 2 个属的 2 种嗜盐微生物，均为嗜盐古菌；从什锦菜样品中未分离出任何嗜盐微生物；从辣酱样品中共分离出 6 个属的 8 种嗜盐微生物，其中嗜盐古菌 4 个属的 6 种，嗜盐细菌 2 个属的 2 种；从宝塔菜样品中共分离出 1 个属的 1 种嗜盐微生物，均为嗜盐细菌；从酱油蜜瓜样品中共分离出 1 个属的 1 种嗜盐微生物，均为嗜盐细菌，见表 2。可见在 AS-168 培养基培养条件下，易分离出嗜盐细菌；在NOM 培养基培养条件下，易分离出嗜盐古菌。

表 2 21 个嗜盐微生物物种在 7 种高盐食品中的分布

Table 2 Distribution of 21species of halophilic microorganisms in 7 different salted-foods

所属物种	海蜒		虾皮		海带		什锦菜		辣酱		宝塔菜		酱油蜜瓜	
	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N	A	N
Alkalibacillusalmallahensis	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chromohalobactercanadensis	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gracilibacillusbigeumensis	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0
Gracilibacilluskimchii	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Gracilibacillussaliphilus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
Halarchaeumsalinum	0	2	0	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Haloarculahispanica	0	1	0	1	120	400	0	0	0	1	1	0	0	0
Haloarculaquadrata	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Halobacillusyeomjeoni	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Halobacteriumhubeiense	0	9	0	0	0	0	0	0	0	7	1	0	0	0
Halobacteriumjilantaiense	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Halobacteriumsalinarum	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Halorubrumhalophilum	0	0	0	0	0	110	0	0	0	2	1	0	0	0
Lentibacillusjuripiscarius	0	0	0	0	0	0	32	0	0	0	0	0	0	0
Lentibacillussalicampi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Nesterenkoniahalobia	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nesterenkoniahalophila	7	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0
Salimicrobiumsalexigens	0	3	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salinicoccusamylolyticus	0	0	5	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Salinicoccussalsiraiae	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus nepalensis	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

注：A 代表 AS-168 培养基；N 代表 NOM 培养基。

2.2.2 不同培养基分离可培养嗜盐微生物的比较 用 AS-168 培养基共分离出嗜盐菌 9 个属的 12 种,其中嗜盐古菌 3 个属的 3 种,分属 *Halorubrum*、*Halobacterium* 和 *Haloarcula* 属;嗜盐细菌 6 个属的 9 种,分属 *Chromohalobacter*、*Gracilibacillus*、*Lentibacillus*、*Nesterenkonia*、*Salinicoccus* 和*Staphylococcus* 属。而用 NOM 培养基中共分离出嗜盐菌 11 个属的 15 种,其中嗜盐古菌 4 个属的 7 种,分属 *Halorubrum*、*Halobacterium*、*Haloarcula* 和 *Halarchaeum* 属,完全覆盖了 AS-168 培养基中分离出的嗜盐古菌;嗜盐细菌 7 个属的 8 种,分属 *Alkalibacillus*、*Gracilibacillus*、*Halobacillus*、*Lentibacillus*、*Nesterenkonia*、*Salinicoccus* 和 *Salimicrobium* 属(图 3)。可见,NOM 培养基培养出的嗜盐微生物丰富度明显高于 AS-168 培养基。

其中,*Halarchaeum* 属嗜盐古菌只在 NOM 培养基中分离到;*Chromohalobacter* 和 *Staphylococcus* 属嗜盐细菌只在 AS-168 培养基中分离到;*Alkalibacillus*、*Halobacillus* 和 *Salimicrobium* 属嗜盐细菌只在 NOM 培养基分离到。NOM 培养基相对于 AS-168 培养基而言属于寡营养型培养基,嗜盐微生物可能更加适应在寡营养条件生存。

2.3 21 种代表嗜盐微生物胞外酶活测定

在所分离到的 21 种嗜盐菌中,胞外产淀粉酶的有 3 株,占比 14.3%;产酯酶 7 株,占比 33.3%;产明胶酶 1 株,占比 4.8%;产触酶 8 株,占比 38.1%;未分离出产蛋白酶和氧化酶的嗜盐菌,见表 3。

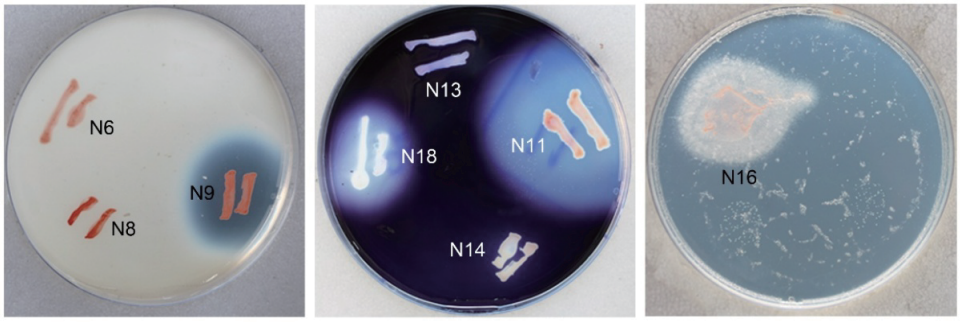
表 3 21 种嗜盐微生物所产胞外酶的活性鉴定

Table 3 Detection of extracellular enzyme activity of 21 halophilic microorganisms

菌株编号	所属物种	淀粉酶	酯酶				明胶酶	触酶	蛋白酶	氧化酶
			吐温-20	吐温-40	吐温-60	吐温-80				
168-1	*Staphylococcus nepalensis*	-	-	-	-	-	-	+	-	-
168-8	*Chromohalobactercanadensis*	-	-	-	-	-	-	+	-	-
168-9	*Gracilibacilluskimchii*	-	-	+	-	-	-	+	-	-
168-11	*Lentibacillusjuripiscarius*	+	-	+	+	-	-	+	-	-
168-13	*Salinicoccussalsiraiae*	-	-	-	-	-	-	+	-	-
168-20	*Gracilibacillusbigeumensis*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-2	*Nesterenkoniahalophila*	-	-	-	-	-	-	+	-	-
N-6	*Haloarculahispanica*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-8	*Halorubrumhalophilum*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-9	*Halobacteriumjilantaiense*	-	-	-	-	-	+	-	-	-
N-11	*Haloarculaquadrata*	+	+	+	+	-	-	-	-	-
N-13	*Halobacteriumhubeiense*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-14	*Halarchaeumsalinum*	-	-	-	-	+	-	-	-	-
N-16	*Salinicoccusamylolyticus*	-	+	-	+	-	-	-	-	-
N-18	*Nesterenkoniahalobia*	+	-	-	-	-	-	+	-	-
N-23	*Halobacteriumsalinarum*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-28	*Lentibacillussalicampi*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-29	*Salimicrobiumsalexigens*	-	-	-	+	-	-	-	-	-
N-30	*Halobacillusyeomjeoni*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-34	*Alkalibacillusalmallahensis*	-	-	-	+	-	-	+	-	-
N-37	*Gracilibacillussaliphilus*	-	-	-	-	-	-	-	-	-

嗜盐古菌 N-9 具有胞外明胶酶活性(图 3(a));嗜盐细菌 168-11 菌株具有胞外淀粉酶、酯酶、触酶活性;嗜盐古菌 N-11 菌株具有胞外淀粉酶(图 3(b))、酯酶活性;嗜盐细菌 N-18 菌株具有胞外淀粉酶(图 3(b))、触酶活性;嗜盐细菌 N-34 菌株具有胞外酯酶、触酶活性;嗜盐细菌 N-16 菌株具有胞外酯酶活性(图 3(c))。

由表 3 得出,产胞外淀粉酶的 168-11、N-11、



（a）产胞外明胶酶菌株　（b）产胞外淀粉酶菌株　（c）产胞外酯酶菌株

图 3　产胞外明胶酶、淀粉酶和酯酶菌株及酶活

Fig. 3　Strains producing extracellular gelatinase, amylase and esterase and enzyme activities

N-18 菌株在各自生境中的占比分别为 100%、2.2%、25.0%。产胞外酯酶的 168-9、168-11、N-11、N-34 菌株在各自生境中的占比分别为 20.0%、100%、2.2%、4.0%，此外产胞外酯酶的 N-14 菌株在辣酱、虾皮、海蜒样品中均分离得到，占比分别为 8.7%、12.5%、8.0%；产胞外酯酶的 N-16 菌株在辣酱、虾皮样品中均被分离得到，占比分别为 13.0%、83.3%；产胞外酯酶的 N-29 菌株在虾皮、海蜒样品中均分离得到，占比分别为 31.3%、12.0%。产胞外明胶酶的 N-9 菌株在其生境中占比为 2.2%。可见，产胞外酶菌株相较于不产胞外酶菌株而言，前者在其生境中具有一定的优势度。其中，168-11、N-16 菌株更是其生境中的优势物种。

2.4　讨论

高盐腌渍和发酵食品由于富含游离氨基酸、小分子糖、醇、酸类物质、维生素等，对嗜盐古菌有较好的筛选和富集作用，蕴藏丰富的新种资源和产酶菌株资源[17]。目前，对于盐湖、盐矿和晒盐场等高盐环境的嗜盐微生物的物种多样性组成方面的研究已经有了较多积累。虽然有关于高盐食品中分离并鉴定出了嗜盐古菌的新物种报道较多，而对于市售常见的高盐产品中的嗜盐古菌的多样性研究较少。由于高盐食品的制作原料、制作方法、添加剂的使用多种多样，由此造成的高盐食品中微生物生境的不同，形成了各自独特的微生物组成结构。作者对 7 种高盐食品中的嗜盐微生物进行了较为系统的研究，拓宽了对不同高盐生境中嗜盐菌的组成的认识。

作者通过纯培养技术，共从 7 种高盐食品生境中挑取了不同形态的菌株 43 株测序，经过基于 16S rRNA 基因的序列相似性分析，初步确定了 7 种高盐食品生境中共有 21 个种 13 个属的嗜盐微生物。其中包括 *Halorubrum*、*Haloarcula*、*Halobacterium*、*Halarchaeum* 4 个属的嗜盐古菌菌株，*Halobacillus*、*Staphylococcus*、*Chromohalobacter*、*Gracilibacillus*、*Lentibacillus*、*Salinicoccus*、*Salimicrobium*、*Nesterenkonia*、*Alkalibacillus* 9 个属的嗜盐细菌菌株。这些菌株之前也被一些学者从其相应生境中分离得到，且与作者在本研究中得到的结果具有一定相似性。如江苏大学韩冬在分析 4 种产地的盐渍海带中嗜盐古菌多样性中，其中山东荣成、福建霞浦 2 种产地的盐渍海带的嗜盐古菌优势物种来自 *Haloarcula* 属[17]，与本研究得到结果一致。西华大学张琦在四川泡菜盐卤中分离出 54 株嗜盐细菌，分属 3 个属，*Staphylococcus* 属为其中之一[18]。在本研究中作者也分离出 *Staphylococcus* 属菌株，且为辣酱样品中的优势物种。大连工业大学李可心在盘锦地区蝾虾酱中分离出 62 株嗜盐菌，其中 *Salinicoccus* 属 4 株，*Lentibacillus* 属 3 株，均为主要物种[19]。本研究中，虾皮样品中优势物种来自 *Salinicoccus* 属；酱油蜜瓜样品中唯一分离出菌株来自 *Lentibacillus* 属，什锦菜样品中优势物种也来自 *Lentibacillus* 属。

3　结　语

以嗜盐古菌作为产酶来源已经成为一个新的研究热点，主要应用于化工、制药、石油、水产、发酵等工业生产中[20]。作者从 21 种嗜盐菌株中筛选出了胞外产淀粉酶 3 株，产酯酶 7 株，产明胶酶 1 株，产触酶 8 株。初步判断，产酶菌株在其生境中同时也具有一定的优势度，且有些菌株具有产多种胞外酶

的特征。高盐生境具有一定的复杂性,某些嗜盐菌为了适应复杂的生存环境进化出产多种胞外酶的特性。因此相较于不产酶菌株,产酶菌株更具有生存优势。

参考文献:

[1] 谢莹. 盐井嗜盐菌多样性的初步研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2007.
[2] 何敏艳,邹正中,蔡林,等. 连云港台北和盐城三圩盐田土壤嗜盐菌多样性研究[J]. 微生物学通报,2008,35(5):737-742.
[3] XU Y,ZHOU P J,TIAN X Y. Characterization of two novel haloalkaliphilic archaea *Natronorubrum bangense* gen. nov.,sp. nov. and *Natronorubrum tibetense* gen. nov.,sp. nov.[J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**,1999,49:261-266.
[4] HAN J,WU L P,LIU X B,et al. Biodegradation and biocompatibility of haloarchaea-produced poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) copolymers[J]. **Biomaterials**,2017,139:172-186.
[5] XUE Q,LIU X B,LAO Y H,et al. Anti-infective biomaterials with surface-decorated tachyplesin I [J]. **Biomaterials**,2018,178:351-362.
[6] 陈学云,侯鲁娜,丁玉庭. 盐干带鱼中葡萄球菌的分离鉴定及其特性研究[J]. 肉类工业,2010,349(5):35-38.
[7] 王宇,迟乃玉,李兵,等. 腌制咸鱼中嗜盐菌分离鉴定及特性研究[J]. 中国酿造,2010(3):26-29.
[8] 孙业盈,单长民,武玉永. 蜢子虾酱中度嗜盐菌的分离、鉴定及特性研究[J]. 中国酿造,2011,236(11):94-97.
[9] 吕彦,孙业盈. 蟹酱中度嗜盐菌的分离、鉴定及特性研究[J]. 中国酿造,2012,31(7):32-35.
[10] 许爱清,周士镭,冯杏杏,等. 一株墨鱼干源中度嗜盐菌的系统发育分析与生长特性[J]. 食品工业科技,2013,34(21):175-179.
[11] 王锐,陈绍兴. 嗜盐古菌几种常见胞外酶研究进展[J]. 微生物学通报,2021,48(3):830-841.
[12] 于靖,杨锡洪,梁晨,等. 嗜盐微生物对发酵海鲜调味品风味影响研究进展[J]. 食品与机械,2020,36(6):203-207.
[13] AKOLKAR AV,DURAI D,DESAI AJ. *Halobacterium* sp. SP1(1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation[J]. **Journal of Applied Microbiology**,2010,109:44-53.
[14] 石云云,李信志,张桂敏. 微生物嗜盐酶的研究进展[J]. 微生物学报,2017,57(8):1180-1188.
[15] 陈礼楠,李峰,孙思琪,等. 安徽定远盐矿可培养嗜盐微生物多样性[J]. 微生物学通报,2019,46(9):2186-2197.
[16] HALL TA. BioEdit:a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. **Nucleic Acids Symposium Series**,1999,41:95-98.
[17] 韩冬. 盐渍海带中嗜盐古菌多样性及其胞外蛋白酶研究[D]. 镇江:江苏大学,2020.
[18] 张琦. 四川泡菜中嗜盐微生物的分离与鉴定[D]. 成都:西华大学,2013.
[19] 李可心. 盘锦地区蜢虾酱中嗜盐微生物分离及新种鉴定[D]. 大连:大连工业大学,2019.
[20] 徐佳琪. 西藏地区盐环境嗜盐古菌多样性及产酶特性研究[D]. 镇江:江苏大学,2017.