

新疆阿克苏地区盐碱地细菌类群多样性及 优势菌群分析

郑贺云^{1,2} 黎志坤² 李超^{1,2} 张鲜姣² 胡建伟¹ 朱红惠^{2*}

(1. 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室 塔里木大学 生命科学学院 新疆 阿拉尔 843300)

(2. 广东省科学院微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广东华南应用微生物重点实验室-省部共建重点实验室培育基地 广东 广州 510070)

摘要:【目的】研究新疆阿克苏地区盐碱土样中细菌类群多样性和优势种群, 及其与环境因子的相关性。【方法】采用基于 16S rDNA 的变性梯度凝胶电泳(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)、克隆测序和典型相关性分析(CCA)的方法。【结果】优势菌群序列分析表明有 29 个序列属于未培养的微生物, 其他 43 个序列分属细菌的 9 个目: 粘球菌目(Myxococcales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、根瘤菌目(Rhizobiales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、伯克氏菌目(Burkholderiales)、放线菌目(Actinomycetales)、海洋螺菌目(Oceanospirillales)、黄杆菌目(Flavobacteriales)、交替单胞菌目(Alteromonadales), 21 个属。【结论】新疆阿克苏地区土壤中的微生物丰富度非常高, 存在大量的细菌类群, 优势菌群不尽相同, 盐碱土样中微生物群落结构与环境因子是密切相关的。

关键词: 盐碱地土样, 细菌多样性, 优势种群, 变性梯度凝胶电泳

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170009); 广东省自然科学基金项目(No. 10151007002000008); 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放基金课题重点项目(No. BRZD1004)

*通讯作者: Tel: 86-20-87686803; 信箱: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-11-19; 接受日期: 2011-12-28

Analysis of the bacterial diversity and dominant population in Akesu Saline-alkali in Xinjiang

ZHENG He-Yun^{1,2} LI Zhi-Kun² LI Chao^{1,2} ZHANG Xian-Jiao²
HU Jian-Wei¹ ZHU Hong-Hui^{2*}

(1. Xinjiang Production & Struction Corps Key Laboratory of Protection & Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, College of Life Science, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, State Key Laboratory Cultivation Base, Province & Ministry Co-constructed South China Applied Microbiology Laboratory, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: [Objective] The research was conducted to study on the bacterial community diversity and dominant population in Xinjiang akesu area and the correlation with the environmental factor. **[Methods]** The bacteria diversity and dominant population was analysis by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), cloning, sequencing and the DGGE sequence analysis and the canonical correlation analysis (CCA). **[Results]** The sequencing of the dominant population showed that there were 29 sequencing belong to the un-cultivation microbial, and the other 43 DGGE band were made up by 9 order: Myxococcales, Pseudomonadales, Rhizobiales, Bacillales, Burkholderiales, Actinomycetales, Oceanospirillales, Flavobacteriales, Alteromonadales. **[Conclusion]** Canonical correlation analysis (CCA) result showed that microbial community structure and environmental factors were closely related in saline-alkaline soils.

Keywords: The soil sample of saline-alkali, Bacterial diversity, Dominant population, DGGE

盐渍土系指土壤含有可溶盐类、钾、钠、镁的氯化物、硫酸盐、重碳酸盐等。其分布地域跨度较大, 类型多样^[1]。盐渍化土壤一直被认作是“生命禁区”, 但凭借科研工作者多年的工作积累认识, 欧、美、俄等国首先开展对极端环境微生物的研究, 我国在 20 世纪 50—60 年代才开始极端环境微生物区系分布研究, 从 20 世纪 70 年代后期才开展了新疆特殊环境微生物分离和筛选工作^[2]。由于缺乏适宜盐渍化土壤环境条件下微生物的分离和培养方法, 因此极端盐渍化生态环境下土壤微生物类群的研究至今仍然很少, 极端盐渍化生态环境下微生物资源的开发与利用研究更是少之又少。探索 and 开发极端盐渍化生态环境土壤微生物资源具有重要的意义。

阿克苏地区地处新疆维吾尔自治区中部, 天山山脉中段南麓、塔里木盆地北缘, 东经 78°03′至 84°07′, 北纬 39°30′至 42°41′间, 总面积 13.2 万 km²。其中盐碱地 1.26×10⁵ hm, 占总灌溉面积 5.37×10⁶ hm 的 23.5%。由于阿克苏地区气候干旱、少雨、内蒸发量大, 加上地形封闭, 地表水向盆地输盐量大, 排水不畅, 造成下游大面积土壤盐碱化; 生态系统遭到严重的破坏, 生态平衡失调, 对农牧业可持续发展有着深刻的影响。本研究以阿克苏地区不同类型盐渍化土壤为研究对象, 利用分子生态学的 PCR-DGGE 技术分析新疆阿克苏地区土壤细菌类群多样性及优势种群, 研究结果将为盐碱极端环境下细菌资源分离和研究提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

本研究采集了新疆阿克苏地区盐碱地的土壤, 共 52 个样, 采样点具体分布和采样点信息如图 1 和表 1 所示。按 5 点取样法取 0–30 cm 土壤, 样品自然风干后保存在 4 °C 冷库备用。

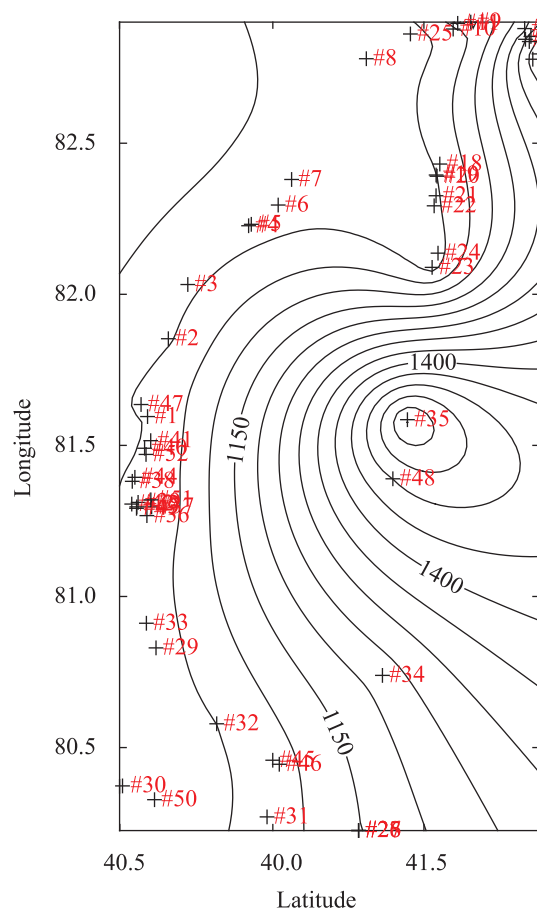


图 1 采样点分布图

Fig. 1 The map of sampling sites

1.2 理化指标的测定

利用油浴加热重铬酸钾氧化——容量法^[3]、质量法^[4]和水浸法^[5](土壤:水=1:5)确定其中 3 项理化指标作为评价项目: 土壤有机质、水溶性盐总量及 pH, 每个样品有 2 个重复, 取其平均值。

1.3 样品基因组总 DNA 的提取和 PCR 扩增

采用修改后的 Bead-Beating 法^[6]对盐碱地土

壤微生物总 DNA 进行提取, 并且使用 Promega 公司的 Wizard DNA Clean-Up system 试剂盒对其进行纯化。

以提取的土壤总 DNA 作为模板, 采用巢式 PCR 策略, 第一次 PCR 使用细菌 16S rDNA 通用引物 F27 和 R1522^[7], 片段长度约为 1 500 bp; PCR 反应体系(50 μ L)组成是: 10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 5 μ L, 引物 1 和 2 (10 μ mol/L)各 1 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L, 模板 DNA 2 μ L, 加去离子水补齐 50 μ L。程序如下: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 35 个循环。第二次 PCR 使用特异性引物 GC-357F 和 518R^[8]对细菌 16S rDNA V3 区进行扩增, 片段长度约为 220–230 bp。反应体系同上, 程序如下: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 40 s, 共 30 个循环。

1.4 变形梯度凝胶电泳(DGGE)分析

使用美国 Bio-Rad 公司的 The D-code Universal Mutation Detection System 电泳系统进行变性梯度凝胶电泳。使用 10%的聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:双丙烯酰胺=37.5:1), 选用的变性剂梯度为 30%–60% [100%的变性剂中含有 7 mol/L 的尿素和 40% (V/V)的去离子甲酰胺], 每个样品上样量为 25 μ L PCR 浓缩产物(175–180 ng/ μ L)。运行条件: 1 \times TAE [40 mmol/L Tris, 40mmol/L 冰乙酸, 1.0 mmol/L EDTA (pH 8.0)]电泳缓冲液中, 恒温 60 °C, 30 V 电泳 30 min 后, 150 V 电泳 6 h。

电泳完毕后, 用 ddH₂O 漂洗凝胶, 再用 5%的 Goldview 核酸染料染色 30 min, 在 Image Quant350 (GE health)成像系统下拍照。

1.5 DGGE 优势条带切胶测序分析

根据 DGGE 图谱, 挑选一些共有或特有的优势条带(亮带), 在紫外灯下用无菌手术刀片把选定的条带从凝胶上切割下来, 随即浸泡于 50 μ L 超纯水中, 并置于 4 °C 过夜。用所得的浸提液作

为模板进行 PCR 扩增, 引物分别为不含 GC 夹的 357F 和 518R, PCR 反应体系和扩增程序与之前的相同。得到的 PCR 产物经 DNA 凝胶回收试剂盒(Omega)进行纯化后与克隆载体(pGEM-T)连接, 得到的阳性克隆子送往上海英俊有限公司测序。将测序结果在 GenBank 数据库中进行比对分析, 找出相似序列。

1.6 数据分析

1.6.1 DGGE 电泳图谱分析: 使用 Quantity one V4.6 (Bio-Rad)软件对 DGGE 电泳图谱进行分析, 将 DGGE 图谱中包含的信息进行量化处理, 以二进制的格式输出。多样性指数(H)、物种丰度(S)指标被用来比较各个样品的细菌多样性。计算公式如下:

$$H = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = -\sum_{i=1}^S (N_i/N) \ln (N_i/N)$$

其中, p_i 是某个样品中单一条带的强度在该样品中的所有条带总强度中所占的比率, S 是某个样品中所有条带数目总和。

1.6.2 土样中微生物多样性与环境因子的相关性分析: 运用生物统计学软件 CANOCO for windows (Version 4.5)对 DGGE图谱量化后的数据进行典型对应分析(CCA), 研究各个土样中微生物多样性与其理化指标的相关性。分析过

程中去除了相对含量小于 1%和只出现过一次的条带。

2 结果与分析

2.1 样品理化性质结果分析

本实验所测定土样的理化性质如表 1 所示, 新疆阿克苏地区土壤的 pH 都维持在 7.57–8.75 碱性水平, 而且土样较为贫瘠, 相对较丰富的土壤的有机质含量也仅为 30.35 g/kg, 但土壤的含盐量高, 最高可达和 346.80 g/kg。

2.2 DGGE 指纹图谱分析

提取的土壤基因组总 DNA 经过纯化后直接进行巢式 PCR 扩增, 第一轮扩增出 1.5 kb 的片段, 第二轮扩增获得片段大小在 230 bp 左右的目的条带直接用于 PCR-DGGE 分析。

DGGE 图谱能直观地反映出不同盐碱土壤细菌 16S rDNA 的多样性, 即可在分子水平上反映不同土壤细菌种群结构多样性。在 DGGE 指纹图谱中, 不同位置的条带代表不同的细菌类群, 亮度反映出不同细菌类群相对量的多少, 亮度大的一般被认为是该样品中的优势细菌。在不同泳道同一横向位置的不同条带一般被认为是同一个细菌类群。由图 2 可见, 52 个土壤样品的 DGGE 图谱中电泳条带数目、强度和迁移率均存在一定

表 1 采样点信息和理化性质						
Table 1 Distribution of the sampling information and physics-chemical characterization of the soil						
土样编号 Soil No.	土质 Soil quality	采集地信息 Collection sites	主要植物 Major plant	有机质 Organic (g/kg)	水溶性盐总量 Water-soluble salt (g/kg)	pH
1#	泥沙	13 团路口	红柳	18.55	185.70	8.28
2#	沙土	S217 269km	红柳、黑果枸杞	10.65	118.85	8.43
3#	泥沙	S217 139km	骆驼刺、红柳、胡杨	5.39	3.73	8.19
4#	沙土	沙雅二牧场	红柳	10.25	112.95	8.37
5#	泥沙	沙雅二牧场 棉田	棉花、芦苇	7.55	25.80	8.51
6#	沙土	沙雅 碱湖 沙河桥	芦苇	9.64	67.85	8.45
7#	沙土	沙雅	荒漠	19.40	202.65	8.27
8#	沙土	沙雅 努尔巴格乡	苦豆子	6.34	79.90	8.63
						(待续)

(续表 1)

9#	泥沙	S210 49km	荒漠	16.75	204.00	8.61
10#	沙土	比西巴格村	苦豆子	7.34	19.70	8.75
11#	泥土	库车 荒山	荒漠	8.41	69.85	8.12
12#	泥土	盐水沟 公路边	荒山	6.42	30.10	8.12
13#	泥土	盐水沟 深山	荒漠	11.55	39.10	8.08
14#	泥沙	盐水沟 河道、河滩	荒漠	4.44	43.25	8.37
15#	泥土	S307 和 G217 交叉路口山中	荒漠	6.35	36.15	7.85
16#	泥沙	克拉 27 油田河床	荒漠	6.37	38.42	8.07
17#	泥沙	盐水沟收费站深山	荒漠	6.00	37.90	8.12
18#	泥沙	新和城南	芦苇、红柳	8.06	48.30	8.26
19#	沙土	新和	红柳	8.67	127.40	8.65
20#	泥沙	阿瓦提	荒漠	12.75	47.10	7.90
21#	泥沙	新和 G341 820km	荒漠	15.50	148.70	8.24
22#	泥沙	向日葵地	骆驼刺、向日葵	9.55	86.55	8.39
23#	泥沙	G341 830km	红柳	12.20	132.05	8.01
24#	沙土	G341 8881km	芦苇	6.45	66.60	8.29
25#	泥沙	G341 919km 河床	荒漠	7.65	80.65	7.86
26#	泥土	博孜墩乡 盐山上	荒漠	10.80	76.25	7.87
27#	泥沙	博孜墩乡 盐山下	荒漠	7.55	77.40	7.73
28#	泥沙	博孜墩乡盐山下河道	荒漠	7.65	54.60	8.03
29#	沙土	阿克苏 68km	荒漠	11.20	132.80	8.55
30#	泥沙	3 团	荒漠	7.18	11.65	7.99
31#	泥沙	阿瓦提	荒漠	5.94	48.05	8.67
32#	泥沙	阿克苏 40km	荒漠	20.60	223.75	8.37
33#	泥沙	8 团	荒漠	30.35	346.80	8.37
34#	泥沙	五团	芦苇	30.80	98.70	7.96
35#	泥沙	乌恰县	荒漠	11.05	14.75	8.00
36#	沙土	农一师十团护林队排碱沟	毛蜡根际	32.55	7.28	7.55
37#	沙土	农一师十团护林队 排碱沟	芦苇	15.20	31.70	8.44
38#	沙土	十一团	红枣地	10.02	34.70	8.51
39#	沙土	阿拉尔十团 农一师农科所 公路边	荒漠	7.10	16.35	7.57
40#	泥沙	阿拉尔-沙雅公路十三团	碱蓬根际	22.20	199.90	7.96
41#	泥沙	阿拉尔-沙雅公路十三团 排碱沟	红柳	11.30	85.10	7.97
42#	泥沙	滨河路 河滩	芦苇根际	14.90	70.75	7.84
43#	泥沙	阿拉尔电视台	胡杨	10.95	46.45	7.94
44#	沙土	十三团	芦苇	11.05	74.05	8.64
45#	沙土	阿克苏	荒漠	3.99	4.03	8.17
46#	黄沙	六团	荒漠	22.20	234.05	8.29
47#	沙土	良繁场	芦苇	12.75	48.97	8.56
48#	沙土	阿图什	荒漠	6.71	78.75	8.53
49#	泥沙	塔里木大学校园	草坪	14.60	11.75	8.46
50#	沙土	十团	红柳	8.48	35.15	8.46
51#	泥沙	阿拉尔十团 排碱沟	红柳	22.65	6.60	8.05
52#	沙土	十一团	红柳	19.85	130.60	7.95

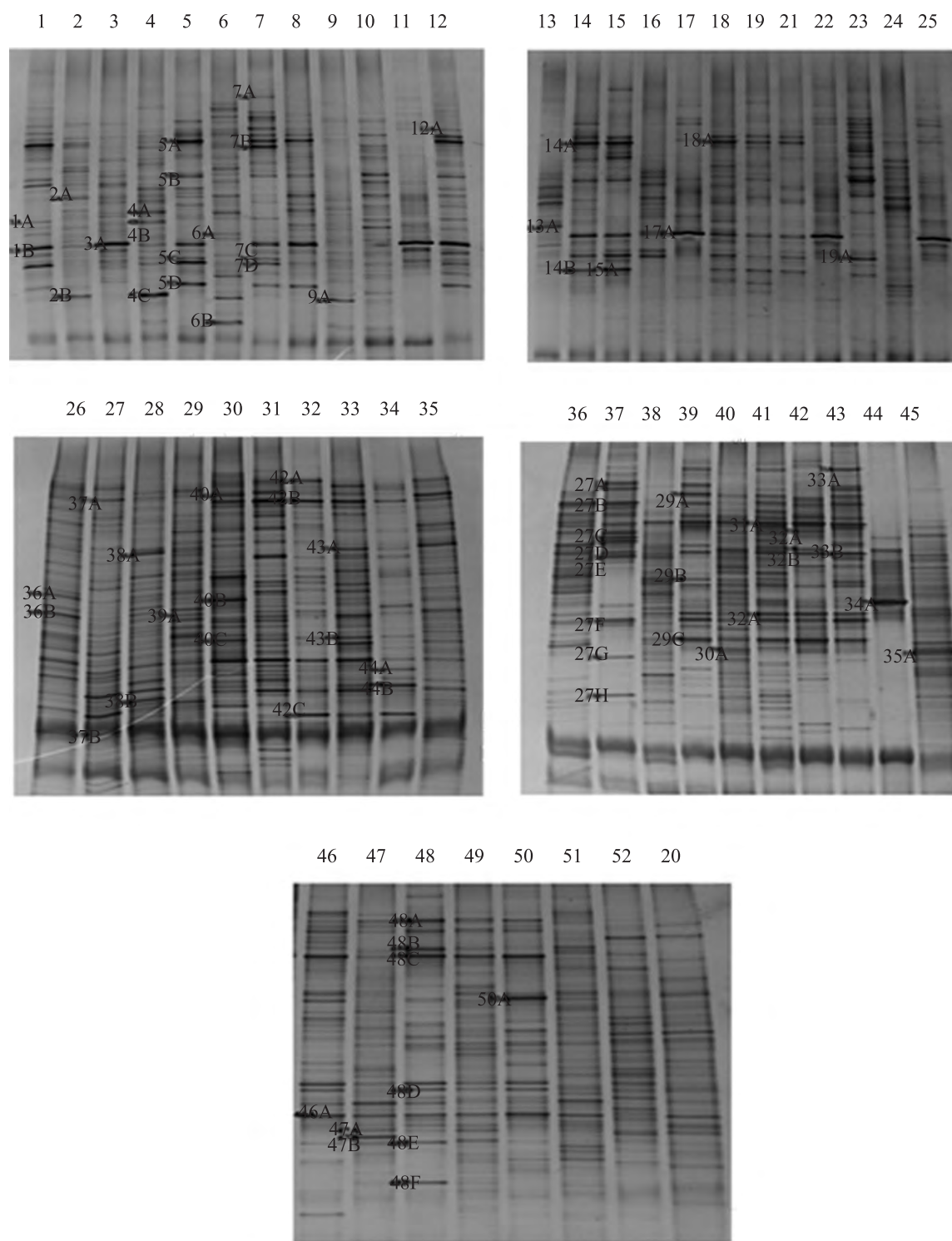


图 2 52 个新疆阿克苏地区土样 DGGE 指纹图谱
Fig. 2 DGGE fingerprint of 52 soil samples in Aksu of Xinjiang

程度的差异,充分显示了微生物的多样性。52个盐碱地土壤样品的条带数在15–58条之间,这说明了新疆阿克苏地区土壤中的微生物丰富度非常高,存在大量的细菌类群。同时,不同土壤的DGGE图谱在位置及条带的亮度上均存在较大的差异,这说明52个土壤样品中细菌优势菌群不尽相同。不同土壤间具有许多共同的条带,说明这些供试土壤之间可能存在一些共有的细菌类型,然而这些公共条带的强度也不相同,表明土壤微生物在DNA水平上有明显改变。30号土壤

在两种DGGE图谱中条带数量相对其它土壤明显多(58条),说明其微生物丰度最高,至少有58个以上的细菌物种组成,其它样品也至少有15个以上的物种组,13号土壤条带数最少(15条)。

所得图像用Quantity one V4.6 (Bio-Rad)软件进行处理,有关泳道和条带的技术处理都用该软件进行。各种土样中样品的多样性指数(H)和物种丰度(S)值变化趋势基本一致,如图3所示。其中第30泳道所代表的盐碱土壤样品的多样性指数(H)和物种丰度(S)值达到最高值,分别为3.78和58。

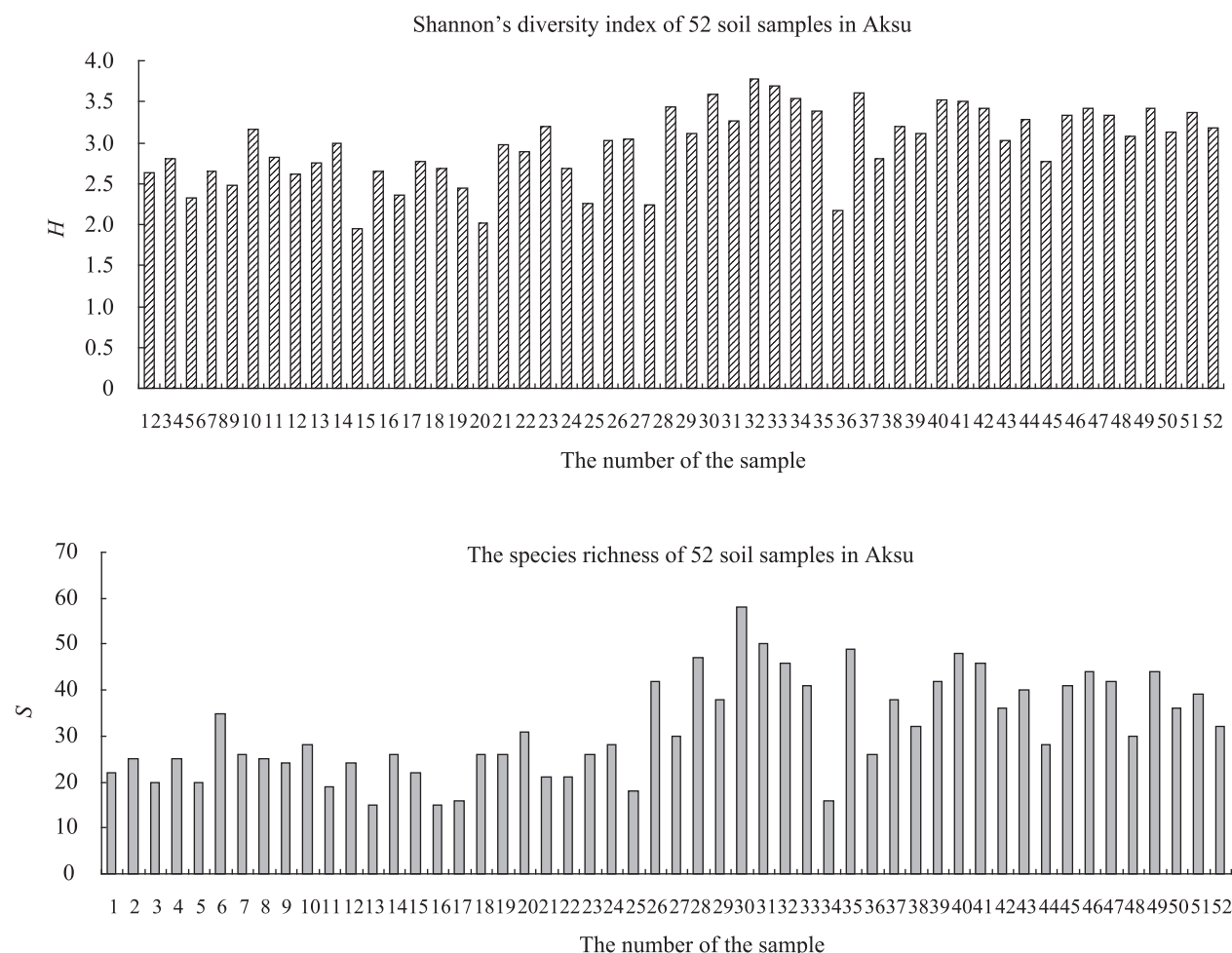


图3 52个新疆阿克苏地区土样细菌类群多样性指数(H)和物种丰度(S)
Fig. 3 Shannon's diversity index and species richness of 52 soil samples in Aksu

2.3 土样中微生物群落结构与理化性质的相关性分析

52 个土样 DGGE 图谱的典型对应排序结果如图 4 所示。在此二维排序图(Biplot)中,样本与环境因子在同一个图上反映出来,可以直观地看出群落分布、物种分布与环境变量之间的关系。环境因子用箭头表示,箭头所处的象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性,箭头连线长度代表该环境因子与样本分布相关程度的大小,而箭头连线间的夹角代表环境因子间的相关性大小^[9-10]。

Lindstrom 将这种统计学方法应用于 DGGE 指纹图谱的分析中,从而找寻微生物群落结构与环境因子的关系。土样中微生物群落结构与 pH、有机质、盐分相关联,其中 pH 与第一排序轴正相关,盐分与第三排序轴正相关。而有机质与微生物群落结构关联度最小。由此可见,新疆阿克苏地区盐碱土样中微生物群落结构与环境因子是密切相关的。

2.4 部分细菌优势条带的序列比对分析结果

通过切胶,克隆测序共得到 72 条序列,经过 BLAST 比对,结果如表 2 所示。从表 2 看出,获得的 72 条序列中有 29 条序列比对结果属于未培养的微生物,占总数的 40.28%,说明盐碱地中存在大量人类还未分离和认知的细菌类群;可培养的 43 条序列分属于 9 个目:粘球菌目(Myxococcales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、根瘤菌目(Rhizobiales)、芽孢杆菌目(Bacillales)、伯克氏菌目(Burkholderiales)、放线菌目(Actinomycetales)、海洋螺菌目(Oceanospirillales)、黄杆菌目(Flavobacteriales)、交替单胞菌目(Alteromonadales), 21 个属

Amorphus、*Myxococcus*、*Acinetobacter*、*Ochrobactrum*、*Exiguobacterium*、*Pseudomonas*、*Bacillus*、*Herbaspirillum*、*Microbacterium*、*Staphylococcus*、*Halomonas*、*Solibacillus*、*Planobacterium*、*Rhodoferrax*、*Paenisporosarcina*、*Salegentibacter*、*Marinobacter*、*Streptomyces*、*Alkalibacillus*、*Salimicrobium*、*Propionibacterium*, 说明盐碱地土壤并不是生命的禁区,相反却存在着丰富的微生物资源;21 个属中以 *Acinetobacter*、*Bacillus*、*Exiguobacterium* 和 *Ochrobactrum* 为主,分别占 43 条序列中的 16.28%、11.63%、11.63% 和 9.30%;其次是 *Staphylococcus*、*Myxococcus*、*Streptomyces* 和 *Microbacterium*, 分别占 6.98%、4.65%、4.65% 和 4.65%。

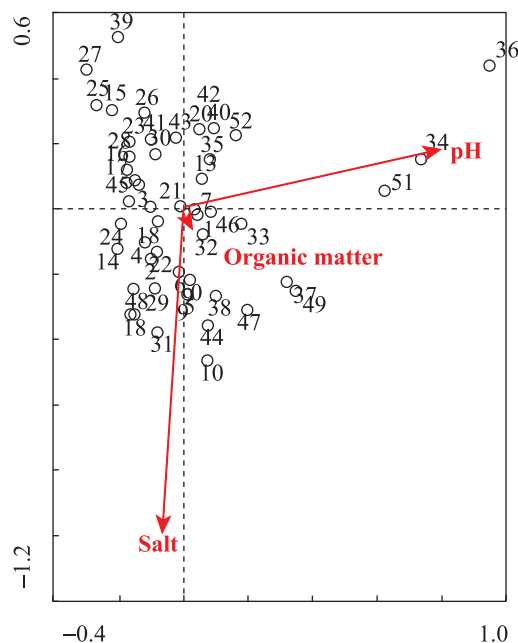


图 4 盐碱地细菌多样性与环境因子的典型对应性分析图

Fig. 4 Canonical correspondence analysis ordination biplots of the DGGE banding patterns and environmental variables

表 2 盐碱地细菌优势种群的比对结果
Table 2 The results of the microbial diversity of saline-alkaline

条带 Band	近缘菌株名称 Closest relatives		相似度 Identity (%)
	来源 Source	登录号 Accession No.	
1A	<i>Amorphus</i> sp. YIM D10	FJ998414.1	99
1B	<i>Myxococcus fulvus</i> ANSMO68	GU477561.1	100
2A	Firmicutes bacterium M71_D94	FM992835.1	92
2B	Uncultured bacterium clone LSH_B21	HM582754.1	93
3A	<i>Myxococcus fulvus</i> ANSMO68	GU477561.1	100
4A	Uncultured bacterium clone B03-03B	FJ542972.1	91
4B	Uncultured bacterium clone LSH_B21	HM582754.1	93
4C	Uncultured bacterium clone	FJ542972.1	99
5A	Uncultured bacterium isolate DGGE gel	GU227554.1	95
5B	<i>Acinetobacter junii</i> DL2	HQ322273.1	100
5C	<i>Ochrobactrum anthropi</i> Nf22SsD	HQ406750.1	100
5D	<i>Exiguobacterium</i> sp.	HQ841060.1	100
6A	Uncultured actinobacterium clone P3C_62	FN687141.1	98
6B	Uncultured bacterium clone F3_141X	GQ263184.1	99
7A	Uncultured bacterium clone ncd503h12c1	HM275381.1	93
7B	<i>Pseudomonas stutzeri</i> strain PL-31	HM275381.1	98
7C	<i>Ochrobactrum anthropi</i> Nf22SsD	HQ406750.1	100
7D	<i>Ochrobactrum</i> sp.	GQ463235.1	100
9A	Uncultured Frankineae bacterium	FM175822.1	100
12A	<i>Acinetobacter junii</i> DL2	HQ322273.1	100
13A	<i>Bacillus infantis</i> ZH15	HQ538752.1	99
14A	<i>Acinetobacter</i> sp. CUL-LAN15K15	HQ841073.1	100
14B	<i>Exiguobacterium</i> sp. p10f-2	DQ837045.1	100
15A	<i>Exiguobacterium</i> sp. IT2	HQ231889.1	98
17A	Uncultured bacterium clone nbw160f08c1	GQ074022.1	100
18A	Uncultured bacterium clone EMar2	FR667010.1	100
23A	Uncultured bacterium clone H2-plate10_G07	HQ176306.1	100
27A	<i>Herbaspirillum</i> sp. AKB-2008-JO114	AM989098.1	100
27B	Uncultured bacterium clone PC500-1B86	HQ434825.1	99
27C	Soil bacterium Pe30	HQ677499.1	100
27D	<i>Ochrobactrum oryzae</i> NIB10	JF313265.1	100
27E	<i>Bacillus</i> sp. JAEA No. 3-2	AB437410.1	98
27F	Uncultured bacterium isolate DGGE gel	HQ018595.1	100
27G	<i>Microbacterium resistens</i> KNUC602	HM047517.1	100
27H	Uncultured bacterium clone Act06	JF261648.1	100
29A	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CJBPI	AM697667.2	100

(待续)

(续表 2)

29B	<i>Halomonas caseinilytica</i> DSM 23509 ^T	FR749914.1	100
29C	<i>Exiguobacterium</i> sp. CUL-LABLG15X15	FR749914.1	100
30A	Uncultured bacterium clone Layer5_G01	HQ883244.1	100
31A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	GU415585.1	100
31B	Uncultured bacterium clone ncd365c05c1	JF019002.1	98
32A	<i>Acinetobacter</i> sp.	HQ841073.1	99
32B	<i>Solibacillus</i> sp. PN5	HQ845333.1	100
33A	<i>Planobacterium taklimakanense</i> X-65	EU718058.1	96
33B	Uncultured <i>Rhodoferrax</i> sp. clone	HQ271434.1	100
34A	Uncultured bacterium clone BE326ant14g05	GQ921365.1	100
35A	Uncultured bacterium clone TP-SL-B-262	HQ864203.1	100
36A	<i>Rhodoferrax</i> sp.	HQ222266.1	100
36B	Uncultured bacterium clone 2S3-21	GQ472330.1	100
37A	<i>Paenisporosarcina quisquiliarum</i> 3552BRRJ	JF309238.1	97
37B	Uncultured bacterium clone	HQ864203.1	100
38A	Uncultured bacterium clone ncd2477f07c1	JF214324.1	100
38B	Uncultured bacterium clone	HQ883244.1	100
39A	<i>Salegentibacter</i> sp.	HM015888.1	92
40A	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone	JF421175.1	97
40B	<i>Marinobacter</i> sp. YCWA26	FJ984783.1	99
40C	<i>Microbacterium testaceum</i> BAC2126	HM355715.1	96
42A	Uncultured bacterium clone	JF231713.1	100
42B	<i>Acinetobacter baumannii</i> clone SW046	GU415599.1	100
42C	<i>Streptomyces albus</i> subsp.	HQ537062.1	100
43A	<i>Bacillus</i> sp. Ulugqat5	HQ711441.1	100
43B	<i>Bacillus aquimaris</i> T8-4M	AB617546.1	100
44A	Uncultured bacterium clone B_CP_10	HQ388491.1	100
44B	Uncultured bacterium clone	HQ883244.1	100
46A	<i>Exiguobacterium</i> sp. I2	HQ418495.1	100
47A	<i>Alkalibacillus salilacus</i> R559	HM179185.1	100
47B	<i>Salimicrobium luteum</i> C15-4	HM179185.1	97
48A	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CJBPI	AM697667.2	100
48B	<i>Staphylococcus warneri</i> MI1-S012	GU808804.1	100
48C	<i>Acinetobacter</i> sp.	HQ841073.1	100
48D	Uncultured bacterium isolate DGGE gel	HQ018595.1	99
48E	<i>Streptomyces</i> sp. FXJ6.348	JF346468.1	100
48F	<i>Propionibacterium</i> sp. 14(27-11)	HM489920.1	100
50A	<i>Bacillus cereus</i> AIMST	HQ650782.1	99

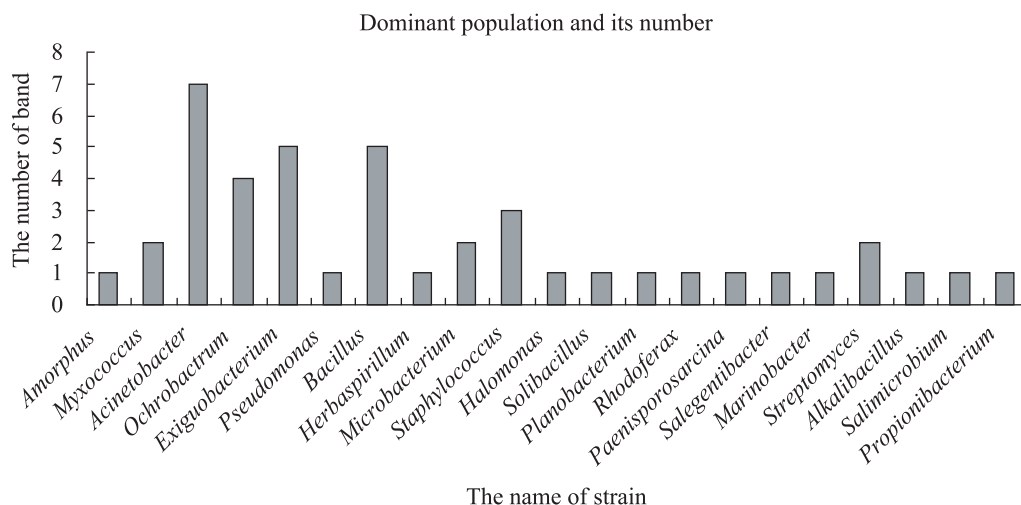


图5 优势菌群及其个数
Fig. 5 Dominant population and its number

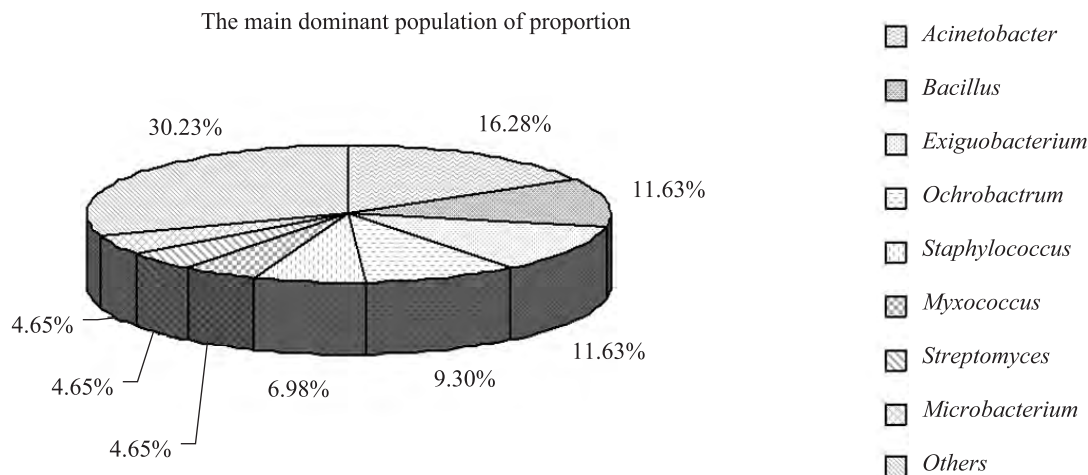


图6 主要优势菌群所占比例
Fig. 6 The main dominant population of proportion

3 讨论

DGGE 电泳条带的多少代表物种的数量,可直观地反映样品细菌的多样性。本文直接从新疆盐碱地土壤样品中提取基因组总 DNA,利用 PCR-DGGE 分析盐碱地中微生物的种群构成。从 DGGE 图谱上可以看出,盐碱地土壤样品中均可分离到 15–58 条不等的条带,说明盐碱地中存在丰富的细菌资源,多样性高。DGGE 图谱中的优

势条带切胶回收克隆测序结果表明,盐碱地中主要的优势种群分布在 9 个目的 21 个属,还有 31 条序列属于未培养菌。先前对研究新疆盐碱地微生物多样性的报道较多,例如周顿等^[11]从新疆拜城地区盐矿山分离到 56 株嗜盐菌分别属于 *Firmicute*、*Gammaproteobacteria*、*Bacillus*、*Halomonas* 和 *Alkalibacillus*。周培瑾等^[12]对新疆艾丁湖和乌宗布那克湖进行研究时就发现并命名了艾丁嗜盐小盒菌 (*Haloarcula aidinensi*

sp. nov.)。顾晓颖等^[15]对巴里坤湖和玛纳斯湖嗜盐菌的分离及功能酶的筛选, 分离得到 51 株嗜盐菌, 基于 16S rDNA 序列的同源性比较和系统发育学分析, 发现从两湖分离的中度嗜盐菌属于 *Planococcaceae*、*Bacillaceae*、*Staphylococcus*、*Halomonadaceae*、*Salicolaceae* 及 *Pseudomonasacaeae* 6 个属。由以上的结果来看新疆盐碱地土样中存在着丰富的微生物资源, 并不是以前所谓的“生命禁区”。

DGGE 图谱切胶测序共 73 条序列, 与 GenBank 数据库比对其近 50% 的序列与之最近的菌株都是未培养菌株, 说明这些菌株可能是目前尚且不能培养或者是难获得纯培养物的新种资源。这些菌株长期适应新疆这种干旱、有机质缺乏、盐碱度较高的极端环境, 最终成为优势菌株, 它们在原生态环境中的生理生化特性以及其具备的生态功能都很难鉴定, 这些极端环境下生存的优势菌株对自然界以及人类的贡献是无法估量的。开发这些微生物资源和具体了解这些优势菌株在盐碱地生态环境中的结构和功能具有巨大的潜能, 我们应该更加深入地试验, 进一步设计培养基, 选择更适合这些优势菌群生长的条件, 筛选到这些极端环境条件下的优势菌株, 对微生物和生态的发展以及改善新疆盐碱地土壤环境等方面的应用具有重要的意义, 更进一步丰富微生物资源。

土壤微生物包括细菌、真菌和放线菌。本研究结果表明新疆盐碱地中有丰富的细菌群落结构, 新疆盐碱地嗜盐放线菌的研究报道较多, 关统伟等^[14]应用纯培养方法从塔里木盆地高盐环境土壤样品中分离到 18 株可培养嗜盐放线菌, 18 株嗜盐放线菌归为 3 个科(*Glycomycetaceae*、*Pseudonocardineae* 和 *Nocardiopsaceae*); 李文均等^[15]从我国新疆、青海等地采集数份盐碱土样或泥样分离中度嗜盐放线菌菌株, 经鉴定后从新

疆、青海分离到的中度嗜盐放线菌分布至少有 3 个科, 5 个属; 就地区分布来讲, 新疆分离到的中度嗜盐放线菌种类要远高于青海。徐丽华等^[16]从新疆、青海的重盐碱地区、盐湖采集样品, 分离其中的嗜盐、嗜碱及低温放线菌。研究了它们在几种盐的不同浓度、不同 pH 条件下的生长情况, 利用多相分类程序进行鉴定, 发现嗜盐放线菌、放线细菌的新科 1 个(*Yaniaceae*), 新属 2 个(*Yaniaand*、*Streptomonospora*), 新种 8 个, 嗜碱放线菌新种 4 个, 低温放线菌新种 1 个。

而真菌作为土壤微生物的主要组成部分, 在土壤中存在多样性和分布的特殊性主要受土壤理化性质和生物特性的影响, 土壤真菌的种类构成可作为土壤生态状况的生物指标, 在整个生态系统的结构和功能上占有十分重要的地位, 但是人们对其多样性的研究甚少, 对新疆盐碱地土壤真菌多样性的研究少之又少。近年来, 受到全球气候变化、环境污染和人类活动等诸多因素的影响, 微生物生物群落多样性和结构都会发生很大的变化。研究盐碱地土壤真菌多样性, 对于认识真菌在土壤中的生态学意义和为人类提供大量生物资源是一项重要的基础性工作, 对于衡量和维持微生物多样性以及研究和防治土传性病害具有重要意义。因此, 应该加强对真菌多样性的研究工作。

4 结论

(1) 试验菌株经形态、生理生化鉴定和 16S rRNA 序列测定, 其中 2 株鉴定为 *Lactobacillus plantarum*, 2 株为 *Enterococcus villorum*, 2 株为 *Enterococcus dispar*, 3 株为 *Enterococcus durans*, 1 株为 *Enterococcus raffinosus*。

(2) 通过抑菌试验可知, 试验菌株对 *E. coli*、*E. bacillus* 有不同程度的抑制作用, 菌株 HZ1、HZ15、HZ24、HZ25、HZ28 和 NN1 对 *S. aureus*

有不同程度的抑制作用。其中菌株 HZ24、HZ25 对 3 株致病菌的抑制作用与益生菌 *L. plantarum* 和 *B. breve* 的差异不显著。因此, HZ24、HZ25 具有益生菌的开发潜力。

(3) 菌株 HZ24、HZ25 生长温度范围广, 属于中温菌, 并具有耐热性、耐酸性、耐盐性, 具有发酵二糖的优良特性和抑菌的益生功能, 可以应用到食品发酵工业生产中。

参 考 文 献

- [1] 陈耀邦. 中国土壤[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [2] 魏东. 论新疆特殊环境微生物资源研究开发意义及建议[J]. 新疆农业科学, 2004, 41(专刊): 1-4.
- [3] 农业部全国土壤肥料总站. 土壤分析技术规范[M]. 北京: 农业出版社, 1993.
- [4] 朱晓涛, 王玉萍. 两种测定土壤全盐量方法的比较[J]. 甘肃农业科技, 2010(4): 14-16.
- [5] 王慎强, 余位培. 影响碱化土壤 pH 测定的主要因素[J]. 土壤通报, 1994, 25(6): 252-255.
- [6] Yeates C, Gillings MR, Davison AD, et al. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification[J]. Biological Procedures Online, 1998, 1: 40-47.
- [7] Brosius J, Dull TJ, Sleeter DD, et al. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Biology, 1981, 48(2): 107-127.
- [8] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied Environmental Microbiology, 1993, 59(3): 695-700.
- [9] 宋巍, 安德荣, 刘雪, 等. DGGE 分析东江流域农村饮用水源中微生物多样性及其与环境因子相关性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(9): 1311-1317.
- [10] Yan QY, Yu YH, Feng WS, et al. Plankton community composition in the Three Gorges Reservoir Region revealed by PCR-DGGE and its relationships with environmental factors[J]. Journal of Environmental Sciences, 2008, 20(6): 732-738.
- [11] 周帧. 新疆拜城地区盐矿山嗜盐微生物多样性及其系统演化研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2007.
- [12] 周培瑾, 徐毅, 肖昌松, 等. 嗜盐小盒菌属新种的鉴定[J]. 微生物学报, 1994, 34(2): 89-95.
- [13] 顾晓颖, 李冠, 吴敏. 巴里坤湖和玛纳斯湖嗜盐菌的分离及功能酶的筛选[J]. 生物技术, 2007, 17(3): 27-30.
- [14] 关统伟, 吴晋元, 张利莉, 等. 新疆塔里木盆地可培养嗜盐放线菌系统发育多样性[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1698-1702.
- [15] 李文均, 唐蜀昆, 王栋, 等. 新疆青海中度嗜盐放线菌生物多样性初步研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 1-6.
- [16] 徐丽华, 李文均, 崔晓龙, 等. 新疆青海极端环境发现大量未知放线菌[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2003, 25(3): 283-292.