

研究报告

青海可可西里嗜碱芽胞杆菌资源调查

王小英¹ 刘国红² 刘波^{2*} 阮传清² 陈峥²

(1. 福州大学生物科学与工程学院 福建 福州 350116)

(2. 福建省农业科学院农业生物资源研究所 福建 福州 350003)

摘要:【目的】了解可可西里嗜碱芽胞杆菌资源多样性及产酶多样性,为芽胞杆菌功能资源挖掘和菌剂开发提供基础。【方法】采用 Horikoshi I 培养基,通过可培养法分离青海可可西里土壤中的嗜碱芽胞杆菌,利用 16S rRNA 基因序列初步鉴定分离获得的芽胞杆菌。采用透明圈法分析分离菌株的产蛋白酶、纤维素酶及木聚糖酶活性。【结果】从青海可可西里土壤中共分离获得 66 株嗜碱芽胞杆菌,根据 16S rRNA 基因序列相似性分析,发现它们隶属于 6 个属 22 个种,分别为芽胞杆菌属(*Bacillus*)、纤细芽胞杆菌属(*Gracilibacillus*)、喜盐芽胞杆菌属(*Halobacillus*)、咸海鲜芽胞杆菌属(*Jeotgalibacillus*)、类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*)和嗜冷芽胞杆菌属(*Psychrobacillus*),其中以芽胞杆菌属(*Bacillus*)为优势属。2 株嗜碱芽胞杆菌与它们最近匹配模式菌株的 16S rRNA 基因序列相似性为 97.00%和 98.65%,为潜在新种。三种酶活检测结果表明产酶菌株约占总分离菌株的 95.00%,其中 55 株具有产蛋白酶活性,27 株具有产纤维素酶活性,8 株能够产木聚糖酶。【结论】青海可可西里蕴藏着较丰富的嗜碱芽胞杆菌资源及丰富的产酶资源,为后续嗜碱芽胞杆菌的挖掘提供理论基础。

关键词: 可可西里,嗜碱芽胞杆菌,蛋白酶,纤维素酶,木聚糖酶

Survey of alkaliphilic *Bacillus*-like resources in Kekexili, QinghaiWANG Xiao-Ying¹ LIU Guo-Hong² LIU Bo^{2*} RUAN Chuan-Qing² CHEN Zheng²

(1. College of Biological Science and Technology, Fuzhou University, Fuzhou, Fujian 350116, China)

(2. Agricultural Bio-resource Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: [Objective] To provide a foundation for new resource mining of the alkalophilic

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31370059); Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2016J01129); Key Science and Technology Special Projects of Fujian Province-Key Agricultural Science and Technology Special Project (No. 2015NZ0003); Scientific and Technological Innovation Team Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (No. 2016PI-43); Youth Elite Plan Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (No. YC2015-17); Public Project of Fujian Province (No. 2015R1018-7, 2015R1101012-9); 948 Project of Agricultural Department of China (No. 2016-X21)

***Corresponding author:** Tel: 86-591-87884601; E-mail: fzliubo@163.com

Received: October 21, 2016; **Accepted:** February 24, 2017; **Published online** (www.cnki.net): March 16, 2017

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370059); 福建省自然科学基金项目(No. 2016J01129); 福建省重大专项项目农业科技重大专项项目(No. 2015NZ0003); 福建省农科院科技创新团队 PI 项目(No. 2016PI-43); 福建省农科院青年科技英才计划项目(No. YC2015-17); 福建省公益项目(No. 2015R1018-7, 2015R1101012-9); 农业部 948 项目(No. 2016-X21)

***通讯作者:** Tel: 86-591-87884601; E-mail: fzliubo@163.com

收稿日期: 2016-10-21; **接受日期:** 2017-02-24; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2017-03-16

Bacillus-like species and development of microbial agents, we studied the species distribution and diversity of *Bacillus*-like isolated from soil samples in Kekexili of Qinghai Province. **[Methods]** Alkalophilic *Bacillus* species were isolated from soil samples using the cultural method on Horikoshi I medium and preliminarily identified based on 16S rRNA gene sequences. Then, strains with ability of protease-, cellulases- and xylanase-producing activity were screened using transparent zone method. **[Results]** A total of 66 strains of alkalophilic *Bacillus* species were obtained and identified as 22 species belonging to 6 genera, *Bacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Paenibacillus*, and *Psychrobacillus*, by 16S rRNA gene sequences similarities analysis. The genus *Bacillus* was the dominant bacteria. There were 2 new potential species of alkalophilic *Bacillus* with 16S rRNA gene similarities 97.00% and 98.65%, respectively. Three enzymes-producing strains accounted for 95.00% of all isolates, including 55 strains with protease activity, 27 strains with cellulase activity, and 8 strains with xylanase. **[Conclusion]** There were rich resources of alkalophilic *Bacillus* species and abundant enzyme-producing strains in Kekexili of Qinghai Province, which provided a great potential of exploitation of alkaliphilic *Bacillus* species.

Keywords: Kekexili, Alkaliphilic *Bacillus* species, Protease, Cellulase, Xylanase

嗜碱芽胞杆菌(Alkaliphilic *Bacillus* species)是一类能够在 pH 9.00 以上生长良好, 通常最适 pH 在 10.00–12.00 之间, 但是在近中性的 pH 6.50 条件下不能生长或者缓慢生长的微生物^[1]。它们能够产生多种在社会生活中有广泛应用的碱性酶类, 如碱性蛋白酶^[2]、碱性纤维素酶^[3]、碱性木聚糖酶^[4]或其他具有生物活性的物质^[5]等, 因而在洗涤、环保、造纸、皮革等行业中有广泛的应用开发价值。近年来, 很多科研人员对嗜碱芽胞杆菌的嗜碱机理^[6-7]、多样性^[8-9]、碱性酶类及其应用^[10]等开展了深入的研究, 但在嗜碱芽胞杆菌资源调查方面的研究报道比较缺乏。

可可西里是 21 世纪初世界上原始生态环境保存较好的自然保护区, 也是我国面积最大、海拔最高、野生动物资源最为丰富的自然保护区之一。可可西里拥有独特的自然环境, 海拔高, 气候寒冷干燥, 土壤类型简单, 多为高山草甸土、高山草原土和高山寒漠土, 其次为沼泽土, 零星分布有盐土、碱土和风沙等, 其自然景观自东南向西北呈现高寒草甸–高寒草原–高寒荒漠更替, 在自然环境和生物多样性保护及科学研究等方面具有重要的科研和生态价值^[11]。但是目前对可可西里土壤中微生物多样性, 特别是芽胞杆菌资源多样性的研究甚少。孙莹等^[12]采用 5 种培养基对可可西里盐碱土壤细菌进

行选择性分离, 获得 5 株细菌, 仅 1 株属于芽胞杆菌——弯曲芽胞杆菌(*Bacillus flexus*); 苏进进等^[13]采用纯培养方法从可可西里鹰咀山前沙地的土壤样品中获得 19 株细菌, 其中 21%是芽胞杆菌属(*Bacillus*); 杨爱臣等^[14]从青藏高原可可西里-唐古拉山冻土区达哈煤矿附近土壤样品中获得 46 株细菌, 有 5 株芽胞杆菌, 其中 4 株是芽胞杆菌属(*Bacillus*), 1 株是类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*)。

本研究通过可培养方法从青海可可西里土壤样品中分离嗜碱芽胞杆菌资源, 以期了解青海可可西里嗜碱芽胞杆菌种群多样性, 同时进行产酶多样性分析, 为后期嗜碱芽胞杆菌的资源开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品: 2013 年 8 月 6 日与 2015 年 8 月 21 日, 从可可西里风火山和五道梁等地采集土壤样品共 12 份, 装入无菌采集袋, 带回实验室 4 °C 保存。土壤样品具体信息见表 1。

1.1.2 分离培养基: Horikoshi I 培养基^[1] (g/L): 葡萄糖 10.0, 蛋白胨 5.0, 酵母浸出物 5.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄ 0.2, Na₂CO₃ 10.0 (单独灭菌), 琼脂 15.0–20.0, pH 9.00, 1.0×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

表 1 可可西里土壤样品具体信息表
Table 1 The information of soil samples collected from Kekexili

编号 No.	采样地点 Sampling position	生境类型 Habitat type	海拔 Altitude (m)	经纬度 Longitude and latitude	pH ^[15]	日期 Date
6572	风火山白花	草根	5 010	98°35'26.18N , 37°05'09.48E	7.51	2013/8/6
6576	风火山	苔藓	5 010	98°35'26.18N , 37°05'09.48E	8.28	2013/8/6
6577	风火山	草根	5 010	98°35'26.18N , 37°05'09.48E	7.37	2013/8/6
6589	五道梁紫花草	草根	4 500	98°35'26.18N , 37°05'09.48E	8.16	2013/8/6
6591	五道梁紫花草	草根	4 500	98°35'26.18N , 37°05'09.48E	7.89	2013/8/6
6594	五道梁路边盆状花	草根	4 500	98°35'26.18N , 37°05'09.48E	8.26	2013/8/6
6598	五道梁紫花草	草根	4 500	98°35'26.18N , 37°05'09.48E	7.93	2013/8/6
6605	五道梁路边红叶草	草根	4 500	98°35'26.18N , 37°05'09.48E	8.19	2013/8/6
6606	五道梁白草	草根	4 500	98°35'26.18N , 37°05'09.48E	8.37	2013/8/6
6608	五道梁路边小草地	草根	4 500	98°35'26.18N , 37°05'09.48E	8.46	2013/8/6
8524	可可西里盐碱地	荒漠	4 424	93°57'N , 35°10'E	9.72	2015/8/21
8517	可可西里盐碱地	荒漠	4 380	94°33'N , 34°59'E	7.94	2015/8/21

1.1.3 pH 耐受培养基: 以 LB 培养基为基础培养基 (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸出物 5.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0–20.0, 用 1.0 mol/L NaOH 溶液调节基础培养基的 pH,使其最终 pH 分别为 5.00、6.00、7.00、8.00、9.00、10.00、11.00、12.00 和 13.00, 1.0×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.4 酶活检测培养基: (1) 纤维素酶活检测培养基(g/L):酵母浸出物 10.0 ,NaCl 5.0 ,胰蛋白胨 10.0 ,羧甲基纤维素钠 10.0 ,琼脂 15.0–20.0 ,pH 9.00 ;显色试剂^[16]: 2.0 g KI , 1.0 g I₂ , 300 mL 水。(2) 蛋白酶活检测培养基(g/L):牛肉浸膏 3.0 ,蛋白胨 10.0 ,NaCl 5.0 ,脱脂奶粉 20.0 ,琼脂 15.0–20.0 ,pH 9.00 ,奶粉与琼脂分开灭菌。(3) 木聚糖酶活检测培养基(g/L): 木聚糖 5.0 ,琼脂 15.0–20.0 ,pH 9.00。以上培养基均 1.0×10^5 Pa 灭菌 20 min ,奶粉灭菌条件为 6.8×10^4 Pa 灭菌 15 min。

1.1.5 主要试剂和仪器: 细菌通用 16S rRNA 基因引物 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'), 由铂尚生物技术(上海)有限公司合成; *Taq* 酶购自铂尚生物技术(上海)有限公司; 100 bp Marker , 购自上海英骏生物技术有限公司。

GelDoc-It Ts Imaging System UVP 凝胶成像

仪, 杭州博日科技有限公司; Life Eco PCR 仪基因扩增仪、PowerPac Basic Bio-Rad 电泳仪、离心机 (Eppendorf Centrifuge 5418R)、微生物表形智能采集器, 福州锐景达光电科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 嗜碱芽胞杆菌资源的分离: 将土壤样品进行 80 °C 水浴 10 min 后, 采用稀释平板涂布法进行芽胞杆菌分离, 具体参考刘国红等^[17]的方法。观察各平板上的菌落形态, 根据菌落大小、颜色、干湿、形状、边缘、透明度等特征区分不同的菌落并进行编号, 统计不同梯度的平板上嗜碱芽胞杆菌菌落数, 计算每个菌株的同一稀释度的平均数; 根据公式: 每克土样中嗜碱芽胞杆菌的含量=同一稀释度的菌落平均数×稀释倍数/含菌样品克数, 计算各样品中嗜碱芽胞杆菌总含量。挑取菌落形态不同的单菌落进行连续划线培养, 直至获得纯培养, 采用-80 °C 甘油冷冻法保藏。

1.2.2 嗜碱芽胞杆菌的 16S rRNA 基因鉴定: 采用苯酚-氯仿法提取芽胞杆菌 DNA^[18]。PCR 扩增采用细菌 16S rRNA 基因通用引物进行扩增。PCR 反应体系(25 μL): 10×Buffer 2.5 μL , 10 mmol/L dNTP mixture 0.5 μL , 10 nmol/L 的 27F 和 1492R 引物各 1 μL ,*Taq* 酶(5 U/μL) 0.3 μL ,DNA 模板 1 μL ,ddH₂O

补充至 25 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳, EB 染色后用凝胶成像系统观察结果。将检测出有条带的菌株的 PCR 产物送铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序。将测出的各菌株 16S rRNA 基因序列通过 EZtaxon-e (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 进行比对分析, 下载相近的模式菌株序列, 经 ClustalX 对齐后, 通过软件 MEGA 6.0^[19-20] (方法为 Neighbor-Joining, Bootstrap 值取 1 000), 构建系统进化树。

1.2.3 pH 耐受实验^[21]: 根据 16S rRNA 基因序列鉴定结果, 挑选代表菌株分别接种于不同 pH 梯度的 LB 培养基上, 倒置于 30 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中, 培养 72 h 后观察菌株的生长情况。

1.2.4 嗜碱芽胞杆菌的多样性分析: 采用物种多样性分析常用的指数 Pielou 均匀度指数、Shannon-Wiener 多样性指数和 Simpson 优势度指数讨论不同采样地嗜碱芽胞杆菌物种多样性。

Shannon-Wiener 多样性指数(H'): $H' = -\sum P_i \ln P_i$ 。

Pielou 均匀度指数(J'): $J' = H' / \ln S$ 。

Simpson 优势度指数(D_j): $D_j = 1 / \sum P_i^2$ 。

S 为总芽胞杆菌种类数, N 为芽胞杆菌个体总数, P_i 是第 i 种的个体数占总个体数的比例。

1.2.5 嗜碱芽胞杆菌资源的酶活分析: 采用透明圈法^[22], 用无菌牙签刮取适量菌体分别点接于木聚糖酶、蛋白酶及纤维素酶活检测培养基平板上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 2 d; 吸取适量显色剂于纤维素酶活检测平板中, 观察平板上产透明圈情况并用游标卡尺测定透明圈、菌落的直径, 计算透明圈直径与菌落直径的比值(H/C 值), 并对平板进行拍照记录。

2 结果与分析

2.1 嗜碱芽胞杆菌资源的分离与鉴定

从 12 份土壤样品中共分离获得嗜碱芽胞杆菌资源 66 株, 其中, 从 3 份风火山土样中共获得了 17 株, 菌落含量均值为 3.77×10^3 CFU/g; 7 份五道梁的土样中获得 33 株, 菌落含量均值为

1.21×10^4 CFU/g; 其余 2 份盐碱地土样中获得 16 株, 菌落含量均值为 1.31×10^4 CFU/g。随着海拔高度的升高, 嗜碱芽胞杆菌菌落含量越来越少。它们的菌落较小, 平均直径范围约为 1 mm–2 mm, 颜色主要有黄色、乳白色及金黄色, 圆形不透明, 表面光滑湿润或粘稠, 边缘整齐, 大多隆起, 少数为扁平。

经 16S rRNA 基因序列鉴定, 66 株菌皆是芽胞杆菌, 隶属于 6 个属 22 个种(表 2), 分别为芽胞杆菌属(*Bacillus*) (12 种, 52 株)、类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*) (6 种, 9 株)、纤细芽胞杆菌属(*Gracilibacillus*) (1 种, 1 株)、喜盐芽胞杆菌属(*Halobacillus*) (1 种, 1 株)、咸海鲜芽胞杆菌属(*Jeotgalibacillus*) (1 种, 2 株)和嗜冷芽胞杆菌属(*Psychrobacillus*) (1 种, 1 株)。芽胞杆菌属(*Bacillus*) 为最优势属, 占总体的 79%, 其次为类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*), 占 14%。短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*) (29 株, 约占芽胞杆菌属的 56%) 为芽胞杆菌属(*Bacillus*) 的最优势种, 其次是耐寒芽胞杆菌(*Bacillus frigoritolerans*) (10 株, 约占 19%)。

2.2 嗜碱芽胞杆菌资源的 pH 耐受性

基于 16S rRNA 基因序列鉴定结果, 挑选 29 株具有不同 16S rRNA 基因序列的代表菌株进行 pH 耐受检测(表 2)。由表 2 可知, 29 株代表菌株中仅 1 株菌的 pH 耐受生长范围是 6.00–11.00, 其余的菌株在 pH 12.00 都可以生长, 约 28% 的菌株可以在 pH 13.00 上生长, 此时的菌落形态呈湿润半透明状且非常稀薄; 31% 的菌株 pH 耐受生长范围为 5.00–12.00, 其最适 pH 都在 8.00–10.00 之间; 有 45% 的菌株 pH 耐受生长范围为 7.00–12.00 或 13.00; 10% 的菌株在 pH 7.00 及以下不生长, 其生长 pH 范围为 8.00–12.00 或 13.00, 最适 pH 在 10.00–11.00 之间。

2.3 嗜碱芽胞杆菌资源的系统发育分析

由图 1 可知, 在系统发育进化树中 29 株代表菌株可分为 4 大类群。

表 2 29 株嗜碱芽胞杆菌的 16S rRNA 基因鉴定、pH 耐受与酶活检测
Table 2 Identification based on 16S rRNA gene sequences, pH tolerance and enzyme activity detection of 29 alkaliphilic *Bacillus* strains

菌株编号 Strain No.	学名 Scientific name	相似性 Similarity (%)	序列号 Accession No.	pH 范围(最适) Range of pH (optimum pH)	蛋白酶 Protease (H/C)	纤维素酶 Cellulase (H/C)	木聚糖酶 Xylanase (H/C)
FJAT-45150	<i>Bacillus aerophilus</i>	100.00	KX767131	5.00–12.00 (10.00)	2.39	5.71	—
FJAT-45131	<i>Bacillus circulans</i>	100.00	KX767112	5.00–12.00 (9.00)	—	2.21	—
FJAT-45152	<i>Bacillus clausii</i>	99.76	KX767133	7.00–13.00 (10.00–11.00)	3.14	1.81	—
FJAT-44612	<i>Bacillus frigoritolerans</i>	99.86	KX767096	7.00–12.00 (8.00)	2.72	1.49	—
FJAT-45169	<i>Bacillus halodurans</i>	99.72	KX767150	6.00–13.00 (9.00–10.00)	2.61	1.55	—
FJAT-44617	<i>Bacillus idriensis</i>	99.79	KX767101	7.00–12.00 (10.00)	2.44	2.69	10.64
FJAT-45139	<i>Bacillus licheniformis</i>	99.72	KX767120	5.00–12.00 (9.00–10.00)	2.18	2.70	—
FJAT-44618	<i>Bacillus mycoides</i>	100.00	KX767102	5.00–13.00 (8.00)	1.48	2.99	3.15
FJAT-45143	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	99.64	KX767124	7.00–12.00 (8.00–9.00)	2.11	1.64	—
FJAT-45137	<i>Bacillus polygoni</i>	97.34	KX767118	7.00–13.00 (9.00)	—	2.99	—
FJAT-45127	<i>Bacillus pumilus</i>	99.79	KX767108	5.00–13.00 (10.00)	4.29	—	—
FJAT-45135	<i>Bacillus pumilus</i>	99.65	KX767116	5.00–12.00 (8.00–10.00)	3.06	—	—
FJAT-45162	<i>Bacillus pumilus</i>	99.86	KX767143	5.00–13.00 (8.00–9.00)	2.67	—	—
FJAT-45172	<i>Bacillus pumilus</i>	99.86	KX767153	6.00–12.00 (9.00–10.00)	1.53	—	—
FJAT-45146	<i>Bacillus siralis</i>	99.86	KX767127	7.00–12.00 (10.00–11.00)	—	—	—
FJAT-45171	<i>Gracilibacillus thailandensis</i>	99.08	KX767152	8.00–12.00 (10.00)	—	3.17	—
FJAT-44687	<i>Halobacillus litoralis</i>	99.09	KX767106	7.00–13.00 (9.00)	3.35	8.04	3.48
FJAT-45167	<i>Jeotgalibacillus campisalis</i>	99.29	KX767148	9.00–13.00 (11.00)	5.23	5.08	—
FJAT-45168	<i>Jeotgalibacillus campisalis</i>	98.87	KX767149	9.00–13.00 (11.00)	6.58	10.12	—
FJAT-44620	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	99.43	KX767104	5.00–12.00 (9.00)	4.40	9.99	2.71
FJAT-45134	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	99.30	KX767115	7.00–12.00 (9.00–10.00)	4.06	2.51	—
FJAT-45160	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	99.37	KX767141	5.00–12.00 (8.00)	4.02	8.75	—
FJAT-45175	<i>Paenibacillus lautus</i>	99.20	KX767156	6.00–12.00 (8.00–9.00)	—	—	—
FJAT-45176	<i>Paenibacillus pinisoli</i>	98.54	KX767157	7.00–13.00 (9.00)	—	1.23	—
FJAT-45136	<i>Paenibacillus provencensis</i>	99.93	KX767117	7.00–12.00 (10.00)	—	6.53	—
FJAT-44615	<i>Paenibacillus terrigena</i>	98.87	KX767099	6.00–11.00 (8.00–9.00)	—	2.82	3.61
FJAT-45145	<i>Paenibacillus tundrae</i>	99.30	KX767126	7.00–12.00 (9.00)	2.94	6.61	—
FJAT-45170	<i>Paenibacillus tundrae</i>	99.23	KX767151	7.00–12.00 (9.00)	3.14	8.35	—
FJAT-45166	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	99.89	KX767147	7.00–12.00 (9.00)	—	—	—

注：—：无产酶活性。

Note: —: No enzyme activity.

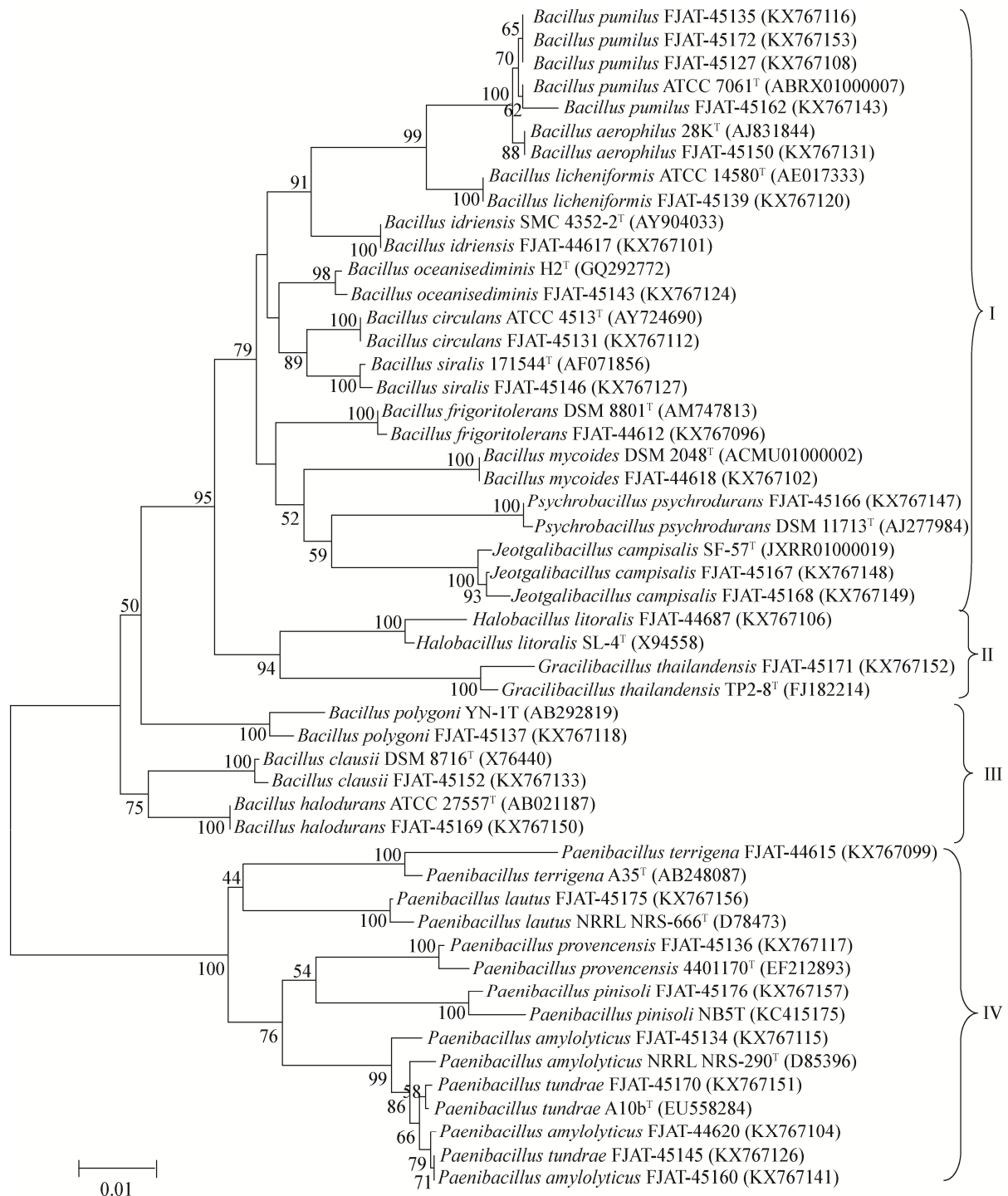


图 1 可可西里分离获得的 29 株代表菌株的系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree of 29 representative strains of alkaliphilic *Bacillus* species isolated from Kekexili based on 16S rRNA gene sequences

注：圆括号内为序列号；大括号表示类别；分支处的数值表示 Bootstrap 值(百分值)(1 000 次抽样)，引导值>50%显示在分支点；比例尺 0.01 表示两个核苷酸的遗传距离。

Note: GenBank accession numbers were given in parentheses. Braces represent categories. Numbers at each branch point indicate the percentage supported by bootstrap values based on 1 000 replications. Bootstrap values>50% are shown at branching points. The scale bar 0.01 indicates per nucleotide position.

第 I 类由咸海鲜芽胞杆菌属(*Jeotgalibacillus*)、嗜冷芽胞杆菌属(*Psychrobacillus*)及部分芽胞杆菌属(*Bacillus*)[嗜气芽胞杆菌(*B. aerophilus*)、环状芽胞杆菌(*B. circulans*)、耐寒芽胞杆菌(*B. frigoritolerans*)、病研所芽胞杆菌(*B. idriensis*)、地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*)、蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*)、海洋沉积芽胞杆菌(*B. oceanisediminis*)、短小芽胞杆菌(*B. pumilus*)及青贮窖芽胞杆菌(*Bacillus siralis*)]组成。

第 II 类包含喜盐芽胞杆菌属(*Halobacillus*)与纤细芽胞杆菌属(*Gracilibacillus*)。

第 III 类是芽胞杆菌属的 rRNA group 6，以嗜碱为主要特性，其中包含了一株潜在新种 FJAT-45137，它与蓼属芽胞杆菌(*Bacillus polygoni*)

模式菌的 16S rRNA 基因序列相似性最高，为 97.34%，可能是潜在新种。

第 IV 类为类芽胞杆菌属，其中包含了一株潜在新种 FJAT-45176，它与 *Paenibacillus pinisoli* 的模式菌 16S rRNA 基因序列相似性最高，达 98.5%，低于种的界限阈值 98.65%。

2.4 嗜碱芽胞杆菌资源的种类多样性

22 种嗜碱芽胞杆菌在三类生境中的分布见表 3。耐寒芽胞杆菌(*B. frigoritolerans*)、病研所芽胞杆菌(*B. idriensis*)、蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*)、岸喜盐芽胞杆菌(*Halobacillus litoralis*)及土地类芽胞杆菌(*Paenibacillus terrigena*)仅在荒漠上分离获得；地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*)、普罗旺斯类芽胞杆菌(*Paenibacillus provencensis*)与蓼属芽胞杆菌

表 3 不同植被类型下的嗜碱芽胞杆菌的含量分布					
Table 3 The content distribution of alkalophilic <i>Bacillus</i> species in different habitats					
序号 Sequence name	中文名称 Chinese name	学名 Scientific name	荒漠 Wilderness ($\times 10^3$ CFU/g)	苔藓 Lichen ($\times 10^3$ CFU/g)	草根 Grassroots ($\times 10^3$ CFU/g)
1	嗜气芽胞杆菌	<i>Bacillus aerophilus</i>	0	0	0.04
2	环状芽胞杆菌	<i>Bacillus circulans</i>	0	0	0.01
3	克劳氏芽胞杆菌	<i>Bacillus clausii</i>	0	0	0.01
4	耐寒芽胞杆菌	<i>Bacillus frigoritolerans</i>	23.71	0	0
5	耐盐芽胞杆菌	<i>Bacillus halodurans</i>	0	0	0.01
6	病研所芽胞杆菌	<i>Bacillus idriensis</i>	1.17	0	0
7	地衣芽胞杆菌	<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0.31	0
8	蕈状芽胞杆菌	<i>Bacillus mycoides</i>	0.30	0	0
9	海洋沉积芽胞杆菌	<i>Bacillus oceanisediminis</i>	0	0	0.01
10	蓼属芽胞杆菌	<i>Bacillus polygoni</i>	0	0.02	0
11	短小芽胞杆菌	<i>Bacillus pumilus</i>	0	0.02	21.60
12	青贮窖芽胞杆菌	<i>Bacillus siralis</i>	0	0	7.20
13	泰国纤细芽胞杆菌	<i>Gracilibacillus thailandensis</i>	0	0	0.02
14	岸喜盐芽胞杆菌	<i>Halobacillus litoralis</i>	0.05	0	0
15	盐地咸海鲜芽胞杆菌	<i>Jeotgalibacillus campisalis</i>	0	0	0.05
16	解淀粉类芽胞杆菌	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	0.40	0	0.12
17	灿烂类芽胞杆菌	<i>Paenibacillus lautus</i>	0	0	0.01
18		<i>Paenibacillus pinisoli</i>	0	0	0.02
19	普罗旺斯类芽胞杆菌	<i>Paenibacillus provencensis</i>	0	0.01	0
20	土地类芽胞杆菌	<i>Paenibacillus terrigena</i>	0.70	0	0
21	苔原类芽胞杆菌	<i>Paenibacillus tundrae</i>	0	0	2.01
22	忍冷嗜冷芽胞杆菌	<i>Psychrobacillus psychrodurans</i>	0	0	0.30

注：0：未分离获得。
Note: 0: Non separation.

(*B. polygoni*)仅在苔藓土上分离获得;海洋沉积芽胞杆菌(*B. oceanisediminis*)、嗜气芽胞杆菌(*B. aerophilus*)、环状芽胞杆菌(*B. circulans*)、克劳氏芽胞杆菌(*Bacillus clausii*)、耐盐芽胞杆菌(*Bacillus halodurans*)、青贮窖芽胞杆菌(*B. siralis*)、泰国纤细芽胞杆菌(*Gracilibacillus thailandensis*)、盐地咸海鲜芽胞杆菌(*Jeotgalibacillus campisalis*)、灿烂类芽胞杆菌(*Paenibacillus lautus*)、*P. pinisoli*、苔原类芽胞杆菌(*Paenibacillus tundrae*)及忍冷嗜冷芽胞杆菌(*Psychrobacillus psychrodurans*)仅在草根土上分离获得;短小芽胞杆菌(*B. pumilus*)在苔藓土及草根土这两类生境中都有分布;尚未发现该地区中这三类生境中皆有嗜碱芽胞杆菌分布。

以生境类型为样本,以嗜碱芽胞杆菌种类为指标进行聚类分析(图2)。当欧式距离为5时,三类生境可聚为两大类,其中苔藓与草根聚为一类,这一类分布着部分相同的嗜碱芽胞杆菌种类,荒漠生境单独聚为一类。以嗜碱芽胞杆菌种类为样本,以生境类型为指标,进行聚类分析(图3)。当欧式距离约为5时,22种嗜碱芽胞杆菌可聚为三类,短小芽胞杆菌(*B. pumilus*)与耐寒芽胞杆菌(*B. frigoritolerans*)

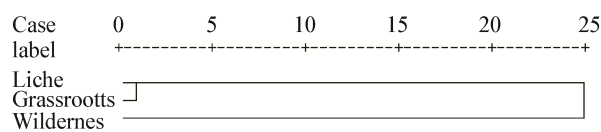


图2 可可西里土壤样品中不同植被类型的聚类图

Figure 2 Dendrogram of habitat types of the soil samples from Kekexili

分别单独聚为一类,这两类芽胞杆菌含量较多,分别为 23.71×10^3 CFU/g 和 21.62×10^3 CFU/g,其他种类含量较少。

三类生境的香农指数大小为草根>荒漠>苔藓, Pielou 均匀度指数大小为草根>荒漠>苔藓,而 Simpson 优势度指数大小为苔藓>草地>荒漠。

2.5 嗜碱芽胞杆菌资源的酶活分析

66株嗜碱芽胞杆菌的酶筛实验结果见表2。从中发现64株具有产酶活性,约占总数的95%,其中55株具有产蛋白酶活性(图4),盐地咸海鲜芽胞杆菌(*J. campisalis*) FJAT-45168的H/C值高达6.58;27株具有产纤维素酶活性(图5),盐地咸海鲜芽胞杆菌(*J. campisalis*) FJAT-45168的H/C值高达10.12;8株能够产木聚糖酶(图6),病研所芽胞杆菌(*B. idriensis*) FJAT-44617的H/C值高达10.64。

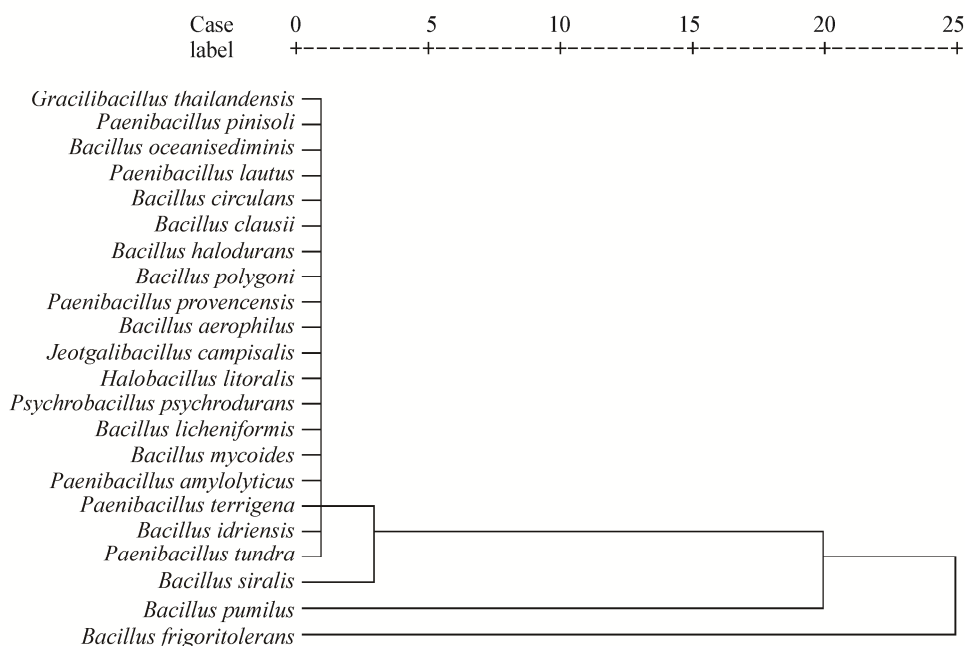


图3 可可西里土壤样品中不同种类的嗜碱芽胞杆菌的聚类图

Figure 3 Dendrogram of alkalophilic *Bacillus* species in the soil samples from Kekexili

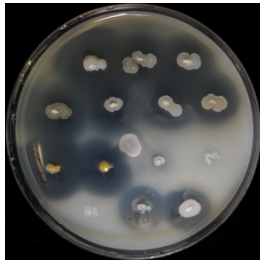


图 4 产蛋白酶活性图

Figure 4 Protease-producing activity

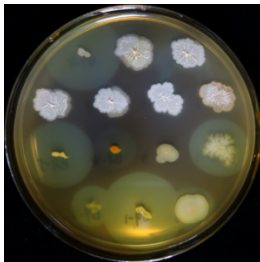


图 5 产纤维素酶活性图

Figure 5 Cellulase-producing activity

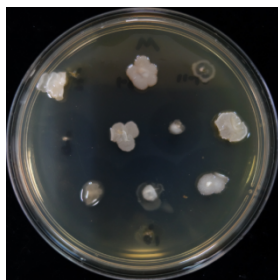


图 6 产木聚糖酶活性图

Figure 6 Xylanase-producing activity

由表 2 可知, 病研所芽胞杆菌(*B. idriensis*) (2 株)、蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*) (1 株)和岸喜盐芽胞杆菌(*H. litoralis*) (1 株)具有产蛋白酶、纤维素酶、木聚糖酶 3 种酶活性; 克劳氏芽胞杆菌(*B. clausii*) (1 株)、耐盐芽胞杆菌(*B. halodurans*) (1 株)、地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*) (1 株)、海洋沉积芽胞杆菌(*B. oceanisediminis*) (1 株)、盐地咸海鲜芽胞杆菌(*J. campisalis*) (2 株)苔原类芽胞杆菌(*P. tundrae*) (2 株)及解淀粉类芽胞杆菌(*Paenibacillus amylolyticus*) (4 株)具有产蛋白酶和纤维素酶活性。土地类芽胞杆菌(*P. terrigena*) (1 株)具有产纤维素酶及木聚糖酶活性。其余种类的嗜碱芽胞杆菌仅具

有产 3 种酶中的一种或不具有产这 3 种酶的特性。

3 讨论

嗜碱芽胞杆菌是盐碱环境中最具代表性的菌群之一, 它们对环境的适应性极强, 与人类社会的关系密切。自从 Vedder 于 1934 年发现并描述了第一株革兰氏阳性、需氧产内生孢子的嗜碱芽胞杆菌(*Bacillus alcalophilus*)^[23]开始, 越来越多的学者对嗜碱芽胞杆菌展开研究。本文采用 Horikoshi I 培养基从青海可可西里地区土壤样品中分离获得 66 株可培养的嗜碱芽胞杆菌, 16S rRNA 基因序列鉴定结果表明它们隶属于 6 个属 22 个种, 以芽胞杆菌属(*Bacillus*)为最优势属, 其次是类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*)。pH 耐受性结果表明, 大部分嗜碱芽胞杆菌 pH 耐受范围是 7.00–12.00, 最适 pH 在 8.00–10.00 之间, 这反映了可可西里土壤具有一定的盐碱度。结合系统发育分析, 当两株菌的 16S rRNA 基因序列相似度低于 98.65% 时, 可判断它们属于两个不同的种^[24]。本研究发现 2 株潜在的芽胞杆菌新种, 即 FJAT-45137 与 FJAT-45176, 它们与最近匹配的模式菌株的 16S rRNA 基因序列相似性皆低于 98.65%, 需要进一步结合多相分类鉴定方法来确定其分类地位, 同时它们的 pH 耐受范围皆为 7.00–13.00, 最适 pH 都在 9.00 左右, 说明可可西里土壤中有丰富的嗜碱芽胞杆菌潜在新物种。

可可西里地区土壤中具有较丰富的嗜碱芽胞杆菌种类, 但含量分布差异较大。耐寒芽胞杆菌(*B. frigoritolerans*)含量最多, 高达 23.71×10^3 CFU/g, 其次是短小芽胞杆菌, 其含量为 21.62×10^3 CFU/g, 含量最少的有环状芽胞杆菌(*B. circulans*)、克劳氏芽胞杆菌(*B. clausii*)、耐盐芽胞杆菌(*B. halodurans*)等, 都只有 10 CFU/g, 该地区芽胞杆菌平均含量是 4.84×10^3 CFU/g, 这与该地区独特的自然环境因素密不可分。

我国地域辽阔、地大物博、土壤资源丰富, 在新疆、内蒙古、青海、西藏等地的一些盐碱环境中潜藏着丰富的嗜碱芽胞杆菌资源。本研究从可可西里土壤样品中获得的嗜碱芽胞杆菌种类与内蒙古

浑善达克地区盐湖^[25]、西藏尼玛县^[26]、青藏高原^[27]、库姆塔格沙漠^[28]、大庆地区^[29]、可可西里鹰咀山前沙地^[13]、黄东海近海海域^[30]等地相比,发现芽胞杆菌属(*Bacillus*)皆为这些地区的优势菌群。此外,本文在可可西里发现的纤细芽胞杆菌属(*Gracilibacillus*)、喜盐芽胞杆菌属(*Halobacillus*)、咸海鲜芽胞杆菌属(*Jeotgalibacillus*)及类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*)在新疆阿克苏^[31]等地区也有发现,在库姆塔格沙漠也被报道有类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*),西藏尼玛县地区也发现了咸海鲜芽胞杆菌属(*Jeotgalibacillus*)。同时,在可可西里土壤样品中发现的比较罕见的嗜冷芽胞杆菌属(*Psychrobacillus*)的忍冷嗜冷芽胞杆菌(*P. psychrodurans*),在黄东海近海海域也被报道过,嗜冷芽胞杆菌属(*Psychrobacillus*)的存在可能与可可西里高寒的气候特点有着密切的联系,进一步表明可可西里土壤中嗜碱芽胞杆菌种类分布的特异性。本研究中发现的地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*)与环状芽胞杆菌(*B. circulans*)在大庆地区也有发现,病研所芽胞杆菌(*B. idriensis*)与短小芽胞杆菌(*B. pumilus*)在可可西里鹰咀山前沙地也有发现,由此可见盐碱环境中的芽胞杆菌资源具有一定的相似性。综上表明在可可西里的土壤中分布着独特的嗜碱芽胞杆菌群落结构和多样性。

土壤中微生物群落结构与生境类型具有一定相关性,本研究中可可西里地区3种生境类型中嗜碱芽胞杆菌群落结构多样性指数中香农-威尔指数大小为草根>荒漠>苔藓,该结果与黄土高原的草原类型土壤细菌多样性指数中香农-威尔指数最小的趋势相反^[32]。王东胜在秦岭主峰太白山北坡的苔藓生境中发现了蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*)和耐寒芽胞杆菌(*B. frigoritolerans*)^[33],但是本文可可西里的苔藓生境土样中未有此发现。本文中虽然短小芽胞杆菌(*B. pumilus*)在苔藓与草根这两类生境中都有分布,但是含量却相差甚远。可见不同植被类型土壤中的微生物群落结构有着较明显的差异,不同地区、同种生境类型中的微生物群落结构也有一定的差异。

嗜碱芽胞杆菌能够产生多种碱适应性的胞外酶,在极端碱性环境中依旧能够保持较高的酶活性及稳定性,是工业酶的重要来源。本研究中有95%的菌株具有产酶活性,有7种嗜碱芽胞杆菌能够产蛋白酶和纤维素酶,首次发现病研所芽胞杆菌(*B. idriensis*)、蕈状芽胞杆菌(*B. mycoides*)和岸喜盐芽胞杆菌(*H. litoralis*)具有产蛋白酶、纤维素酶及木聚糖酶的活性。张万芹等^[34]在贵州兴义喀斯特洞穴土中发现一株能产淀粉酶而不能产蛋白酶的解淀粉类芽胞杆菌(*P. amylolyticus*),本文发现了4株能产蛋白酶及纤维素酶的解淀粉类芽胞杆菌(*P. amylolyticus*),首次发现其中1株具有产蛋白酶、纤维素酶及木聚糖酶这3种酶活性,本研究丰富了解淀粉类芽胞杆菌(*P. amylolyticus*)的产酶多样性。即使在条件恶劣的环境中,可可西里地区土壤样品中的嗜碱芽胞杆菌依然具有丰富的产酶多样性,部分菌株潜藏着高效的产酶活性,这为产酶菌株的开发利用提供了基础。

参 考 文 献

- [1] Horikoshi K. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1999, 63(4): 735-750
- [2] Joshi S, Satyanarayana T. Characteristics and applications of a recombinant alkaline serine protease from a novel bacterium *Bacillus lehensis*[J]. Bioresource Technology, 2013, 131: 76-85
- [3] Prakash P, Jayalakshmi SK, Prakash B, et al. Production of alkaliphilic, halotolerant, thermostable cellulase free xylanase by *Bacillus halodurans* PPKS-2 using agro waste: single step purification and characterization[J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2012, 28(1): 183-192
- [4] Bai WQ, Xue YF, Zhou C, et al. Cloning, expression, and characterization of a novel alkali-tolerant xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. SN5[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2015, 62(2): 208-217
- [5] Białkowska AM, Gromek E, Krysiak J, et al. Application of enzymatic apple pomace hydrolysate to production of 2,3-butanediol by alkaliphilic *Bacillus licheniformis* NCIMB 8059[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2015, 42(12): 1609-1621
- [6] Preiss L, Langer JD, Hicks DB, et al. The c-ring ion binding site of the ATP synthase from *Bacillus pseudofirmus* OF4 is adapted to alkaliphilic lifestyle[J]. Molecular Microbiology, 2014, 92(5): 973-984
- [7] Abbrescia A, Martino PL, Panelli D, et al. The respiratory chains of four strains of the alkaliphilic *Bacillus clausii*[J]. FEBS Open Bio, 2014, 4(1): 714-721
- [8] Wang S, Sun L, Wei D, et al. *Bacillus daqingensis* sp. nov., a halophilic, alkaliphilic bacterium isolated from saline-sodic soil in Daqing, China[J]. Journal of Microbiology, 2014, 52(7): 548-553
- [9] Shi W, Takano T, Liu SK. Isolation and characterization of novel bacterial taxa from extreme alkali-saline soil[J]. World Journal of

- Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(5): 2147-2157
- [10] Ibrahim ASS, Al-Salamah AA, El-Badawi YB, et al. Detergent-, solvent-and salt-compatible thermoactive alkaline serine protease from halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15: purification and characterization[J]. Extremophiles, 2015, 19(5): 961-971
- [11] Kekexili colorful treasure of Qinghai[J]. Qinghai Science and Technology, 2015(4): 39-40 (in Chinese)
璀璨的青海瑰宝之可可西里[J]. 青海科技, 2015(4): 39-40
- [12] Sun Y, Su JJ, Li CL, et al. Isolation and biological characterization of the bacteria from the alkaline soil of Hoh Xil[J]. Microbiology China, 2011, 38(10): 1473-1481 (in Chinese)
孙莹, 苏进进, 李潮流, 等. 可可西里碱性土壤样品细菌的分离和生物学特性[J]. 微生物学通报, 2011, 38(10): 1473-1481
- [13] Su JJ, Zhang YQ, Sun Y, et al. Diversity of culturable and unculturable bacteria in soil samples from Hoh Xil, China[J]. Microbiology China, 2011, 38(7): 1132-1139 (in Chinese)
苏进进, 张玉琴, 孙莹, 等. 可可西里土壤样品中细菌多样性的分析[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1132-1139
- [14] Yang AC, Lv J, Lu JJ. Bacteria isolated from soil samples of Hoh Xil-Tanggula Mountains[J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2012, 30(5): 545-550 (in Chinese)
杨爱臣, 吕杰, 鲁建江. 可可西里—唐古拉山冻土区沉积物样品可培养微生物的研究[J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2012, 30(5): 545-550
- [15] Hou XY. Effects of soil pH on nitrification and community structure of ammonia-oxidizing microorganisms[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2014 (in Chinese)
侯雪燕. 土壤 pH 对硝化作用和氨氧化微生物群落结构的影响[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2014
- [16] Kasana RC, Salwan R, Dhar H, et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine[J]. Current Microbiology, 2008, 57(5): 503-507
- [17] Liu GH, Zhu YJ, Liu B, et al. Diversity of culturable *Bacillus* species from maize (*Zea mays*) rhizosphere soil[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(11): 1367-1379 (in Chinese)
刘国红, 朱育菁, 刘波, 等. 玉米根际土壤芽胞杆菌的多样性[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(11): 1367-1379
- [18] Cheng HR, Jiang N. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(1): 55-59
- [19] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [20] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729
- [21] Liu BB, Tang SK, Ming H, et al. Biodiversity and functional enzymes of cultured halophilic archaeon in Lop Nur region[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(9): 1222-1231 (in Chinese)
刘冰冰, 唐蜀昆, 明红, 等. 新疆罗布泊地区可培养嗜盐古菌多样性及其功能酶筛选[J]. 微生物学报, 2011, 51(9): 1222-1231
- [22] Dong N. Microbial diversity, extracellular enzyme activity and antimicrobial activity of culturable bacteria of soil from grove mountains, East Antarctica[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University Of China, 2014 (in Chinese)
董宁. 东南极格罗夫山土壤微生物多样性及其可培养细菌的产酶和抗菌活性筛选[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2014
- [23] Vedder A. *Bacillus alcalophilus* n. sp.[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1934, 1(1): 141-147
- [24] Kim M, Oh HS, Park SC, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64: 346-351
- [25] Zhang YR. Bacterial Diversity of Haloalkaline Lakes in Desert Hunshandake in Inner Mongolia[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2011 (in Chinese)
张彦茹. 内蒙古浑善达克盐碱湖细菌多样性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2011
- [26] Liu GH, Liu B, Chen QQ, et al. Collection and identification of *Bacillus* species in saline-alkali Habitatsat Nima County, Tibet[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2016, 31(3): 268-272 (in Chinese)
刘国红, 刘波, 陈倩倩, 等. 西藏尼玛县盐碱地嗜碱芽胞杆菌资源采集与鉴定[J]. 福建农业学报, 2016, 31(3): 268-272
- [27] Luo JF, Qu D. Analysis of culturable bacterial community structure in Tibet Plateau soil[J]. Journal of soil and water conservation, 2013, 27(2): 261-266 (in Chinese)
罗建峰, 曲东. 西藏高原土壤中可培养细菌群落结构分析[J]. 水土保持学报, 2013, 27(2): 261-266
- [28] Xu L. The study of soil microbial diversity in Kumtag Desert[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Forestry, 2013 (in Chinese).
许璐. 库姆塔格沙漠土壤微生物多样性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院硕士学位论文, 2013
- [29] Zhang FP, Lin ZW, Zhang ZN, et al. From saline-alkali soil in Daqing and the identification of *Bacillus* spp.[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2011, 23(5): 6-8 (in Chinese)
张飞鹏, 林志伟, 张振南, 等. 大庆盐碱土中微生物的分离及芽胞杆菌的鉴定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2011, 23(5): 6-8
- [30] Sun J. A study on the diversity and preliminary assessment of the antibacterial activities of the bacteria in the Yellow Sea and East China Sea[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Commerce, 2014 (in Chinese)
孙静. 黄东海细菌多样性分析及其抗菌活性的初步评价[D]. 天津: 天津商业大学硕士学位论文, 2014
- [31] Zheng HY. Analysis of the bacterial diversity and isolation identification of microorganisms from Akesu Saline-alkali in Xinjiang[D]. Aral: Master's Thesis of Tarim University, 2012 (in Chinese)
郑贺云. 新疆阿克苏地区盐碱地土壤细菌多样性及菌株的分离鉴定[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2012
- [32] Zeng QC. The soil factors affecting soil microbial under different vegetation ecozones on the Loess Plateau of China[D]. Beijing: Master's Thesis of Research Center of Soil and Water Conservation and Ecological Environment, Chinese Academy of Sciences and Ministry of Education, 2015 (in Chinese)
曾全超. 黄土高原不同植被生态系统土壤微生物多样性及其影响因素研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院(教育部水土保持与生态环境研究中心)硕士学位论文, 2015
- [33] Wang DS. Study of microbial flora and antagonistic actinomycete resources in five habitats on north side of Taibai Mountain, the main peak of Qin Mountains[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A & F University, 2014 (in Chinese)
王东胜. 秦岭主峰太白山北坡 5 种生境中微生物区系及拮抗放线菌资源研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2014
- [34] Zhang WQ, Zhang YG, Fang BZ, et al. Studies on diversity of culturable bacteria in karst cave soil of Xingyi, Guizhou and their protease and amylase activities[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 955-964 (in Chinese)
张万芹, 张永光, 房保柱, 等. 贵州兴义喀斯特洞穴土可培养细菌多样性及其产蛋白酶、淀粉酶活性筛选[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 955-964