

研究报告

四川海螺沟冰川土样芽胞杆菌资源分析

刘琴英^{1,2} 刘国红² 王阶平² 车建美² 陈倩倩² 刘波^{2*}

(1. 福建师范大学生命科学学院 福建 福州 350117)

(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:【背景】芽胞杆菌(*Bacillus-like*)是一类能形成具有强抗性芽胞且可在多种极端环境下存活的细菌,其产生的多种功能代谢产物在多种领域具有重要研究价值。由于冰川低温、寡营养的独特生态环境,其存在的芽胞杆菌可能具有特殊性,因此研究冰川芽胞杆菌有利于发掘新基因、丰富芽胞杆菌多样性。【目的】了解四川海螺沟冰川土壤芽胞杆菌资源,为挖掘芽胞杆菌新资源提供基础。【方法】采用纯培养法分离获得冰川土壤芽胞杆菌资源,利用 16S rRNA 基因进行系统发育分析,测定代表性菌株的生理生化特性并采用类平均法和欧氏距离模型进行聚类分析。【结果】共筛选到可培养细菌 44 株,经 16S rRNA 基因鉴定确定其中 36 株为芽胞杆菌,隶属于 4 个属的 19 个种,分别为芽胞杆菌属(*Bacillus*) 11 个种 24 株、类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*) 2 个种 3 株、短芽胞杆菌属(*Brevibacillus*) 4 个种 5 株和赖氨酸芽胞杆菌属(*Lysinibacillus*) 2 个种 4 株,其中以芽胞杆菌属(*Bacillus*)为优势属。分离菌中仅 3 株芽胞杆菌可在 4 °C 生存,7 株能在 50 °C 生长,大部分菌株在 30 °C 下生长良好;有 74% 菌株能耐碱,有 37% 菌株能在无盐条件下生长。根据生理生化结果,采用类平均法和欧氏距离模型进行聚类分析,可分为 3 组,分别包含 7 种、4 种和 6 种芽胞杆菌。第 1 组均可以水解七叶灵和利用葡萄糖,第 2 组均不能水解七叶灵和利用葡萄糖,第 3 组仅能共同利用葡萄糖。【结论】四川海螺沟冰川土壤蕴藏着较为丰富的芽胞杆菌资源,为芽胞杆菌新资源挖掘提供了资源保障。

关键词: 芽胞杆菌, 冰川, 分离, 鉴定

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31370059); Natural Science Foundation of Fujian Province (2016J01129); Principal Investigator Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (2016PI-43); Youth Talents Program of Fujian Academy of Agricultural Sciences (YC2015-17); Science and Technology Innovation Team Program of Fujian Academy of Agricultural Sciences (STIT2017-1-11)

*Corresponding author: E-mail: fzliubo@163.com

Received: August 16, 2017; **Accepted:** December 19, 2017; **Published online** (www.cnki.net): January 15, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31370059); 福建省自然科学基金(2016J01129); 福建省农业科学院 PI 项目(2016PI-43); 福建省农业科学院青年英才计划(YC2015-17); 福建省农业科学院科技创新团队(STIT2017-1-11)

*通信作者: E-mail: fzliubo@163.com

收稿日期: 2017-08-16; **接受日期:** 2017-12-19; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-01-15

Isolation and identification of *Bacillus*-like species from glacier soil samples collected from Hailuoguo in Sichuan Province

LIU Qin-Ying^{1,2} LIU Guo-Hong² WANG Jie-Ping² CHE Jian-Mei²
CHEN Qian-Qian² LIU Bo^{2*}

(1. College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350117, China)

(2. Agricultural BioResources Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: [Background] *Bacillus*-like bacteria can form endospores with strong resistance and thus, can survive in a variety of extreme environments. Their multiple metabolic products make them have important research value in many fields. Because glacier has the low temperature and oligotrophic unique environment, *Bacillus*-like bacteria in this environment would be specific, which could be expected to enrich the *Bacillus*-like resources and discover new functional genes. [Objective] The aim of this study is to understand the diversity of the *Bacillus*-like resources in the Hailuoguo glacier, Sichuan Province, providing a foundation for mining new *Bacillus*-like resources. [Methods] *Bacillus*-like strains were isolated by the culture-dependent method and identified using 16S rRNA gene sequence. Subsequently, physiological-biochemical characteristics of the typical strains selected were determined and further performed cluster analysis by the group-average method with the Euclidean distance model. [Results] In total, 44 strains were obtained and 36 strains belonged to *Bacillus*-like bacteria. The 16S rRNA gene phylogenetic analysis showed that they could be assigned to 19 species within 4 genera including *Bacillus* (11 species 24 strains), *Paenibacillus* (2 species 3 strains), *Brevibacillus* (4 species 5 strains) and *Lysinibacillus* (2 species 4 strains). Thus, the genus *Bacillus* was dominant. The physiological-biochemical characteristics showed that: i) only 3 strains could survive at 4 °C, 7 strains could grow at 50 °C, whereas most strains could grow well at 30 °C; ii) 74% of the *Bacillus*-like strains had alkali resistance; and iii) 37% of them could grow without NaCl. According to the physiological and biochemical results, those strains could be divided into 3 groups by cluster analysis using the group average method and Euclidean distance models. The first group could hydrolyze esculin and utilize glucose. The second groups could not hydrolyze esculin and utilize glucose, and the third group could only utilize glucose. [Conclusion] Hailuoguo glacier soil is rich in the *Bacillus*-like resources, providing a basis for the mining of them.

Keywords: *Bacillus*-like, Glacier, Isolation, Identification

芽胞杆菌(*Bacillus*-like)是一类产生抗逆性芽胞的重要微生物资源,能产生多种功能代谢产物,可用于生物农药、生物肥料、生物饲料、生物降污、生物保鲜、生物修复、益生菌、医药保健等领域,具有重要的研究价值和开发利用前景^[1]。冰川占据地球陆地面积 10% 的生态环境,因其长期的低温、强辐射和寡营养等环境特征,蕴藏着具有独特生理特性和适应环境变化的微生物。随着近年来冰川退缩的加剧,冰川退缩前沿裸露地微生物群落演替特性受到了诸多研究者的关注^[2],常用的技术手段主要是可培养和高通量测序。利用可培养技术,邢婷婷等研究发现青藏高原木孜塔格冰川、玉珠

峰冰川及扎当冰川可培养细菌生长温度范围均为 0–35 °C,其中玉珠峰冰川和扎当冰川都含有短芽胞杆菌属种类(*Brevibacillus* spp.),后者还获得了芽胞杆菌属种类(*Bacillus* spp.)^[3];李明源等采用 LB 和 PYGV 两种培养基分离慕士塔格峰洋布拉克冰川雪冰及融水中可培养细菌,仅 LB 培养基获得了芽胞杆菌属,2 株菌与蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)亲缘关系很近^[4];Rondón 等研究分析 Pico Bolívar 冰川和冰川融水中可培养细菌的多样性,获得 54 株菌分别为 β-变形菌门、γ-变形菌门、放线菌和拟杆菌^[5];Singh 等对北极冰芯中细菌的分类学特性和潜在的生物学特性研究中获得奇异芽胞杆菌(*Bacillus*

barbaricus)^[6]。通过高通量测序技术, Liu 等调查了中国南北不同气候条件的各 3 个冰川表面初步的微生物群落结构及细菌的多样性^[7]; 张淑红等研究了喀拉昆仑南部熊彩岗日地区冰川细菌属水平的群落结构^[2]; Seok 等分析了斯瓦尔巴德岛冰川土壤微生物的群落结构, 获得 28 个不同的门或类, 其中包括细菌、放线菌和厚壁菌门等^[8]。本文对四川海螺沟冰川土样芽胞杆菌资源进行分析, 以期丰富芽胞杆菌冰川分布的科学数据。

四川海螺沟冰川位于贡嘎山东坡, 青藏高原东南缘, 海螺沟是贡嘎山东坡最主要冰川河, 也是我国最具代表性的季风海洋性山谷冰川之一^[9]。本文采用纯培养法调查四川海螺沟冰川土样中的芽胞杆菌资源, 采用 16S rRNA 基因对分离的芽胞杆菌资源进行系统发育分析, 检测其生理生化特性, 揭示该区域冰川土样中芽胞杆菌多样性, 以期了解四川海螺沟冰川芽胞杆菌种群多样性, 为开发和发掘海螺沟冰川芽胞杆菌资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

2016 年 8 月, 从四川省泸定县磨西镇海螺沟冰川共采集 10 份土样, 东经 101°59', 北纬 29°34', 海拔 3 029 m, 装入无菌袋中带回实验室 4 °C 存放。

1.1.2 培养基

LB 分离培养基(g/L): 酵母浸出物 5.0, NaCl 10.0, 胰蛋白胨 10.0, 琼脂 15–20, pH 7.0–7.2。pH 耐受培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸出物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15–20, 用 1 mol/L NaOH 溶液调节基础培养基的 pH, 使其最终 pH 分别为 5.7、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0。NaCl 耐受培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸出物 5.0, 称取 NaCl 0、10、30、50、70、100 (使其最终 NaCl 浓度分别为 0、1.0%、3.0%、5.0%、7.0%、10.0%), 琼脂 15–20。温度耐受培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸出物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15–20。以上培养基均 1×10^5 Pa 灭

菌 20 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。10×Buffer、dNTPs、*Taq* 酶, 铂尚生物技术(上海)有限公司; 100 bp Marker, 上海英骏生物技术有限公司; NaCl, 西陇科学股份有限公司; Tris/HCl, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; EDTA, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; Tris-saturated Phenol (pH 8.0), 天津市灏洋生物制品科技有限责任公司; API 20E 试剂盒、API 50CH 试剂盒、NaCl 0.85% (5 mL), BioMerieux 公司; 矿物油, 北京索莱宝科技有限公司。

凝胶成像仪, 美国 UVP 公司; 基因扩增仪, 杭州博日科技有限公司; 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; 高速台式冷冻离心机, 德国艾本德股份有限公司; 电子数显卡尺, 桂林广陆数字测控股份有限公司; 生化培养箱, 施都凯仪器设备(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 芽胞杆菌的资源分离

通过温度法和稀释涂布法在 LB 平板上分离冰川土样中芽胞杆菌, 称取 10 g 土壤样本加入 90 mL 的无菌水中, 170 r/min 振荡 30 min 混匀, 即配成 10^{-1} 浓度, 并放置到 80 °C 的水浴中加热 10 min, 杀死其他细菌以及营养体细胞。吸取 1 mL 原液至装有 9 mL 无菌水的试管, 即配成 10^{-2} 浓度, 同法配 10^{-3} 、 10^{-4} 浓度。无菌条件下涂布, 30 °C 培养 48 h, 之后 4 °C 培养 7 d, 根据菌落大小、形态、颜色进行初步筛选分离并纯化, 并将获得的芽胞杆菌菌落通过平板划线法和稀释涂布平板法进行纯化, 获得相应菌落的纯化菌株并保存。

1.2.2 芽胞杆菌的 16S rRNA 基因鉴定

芽胞杆菌基因组 DNA 提取采用苯酚-氯仿法。PCR 扩增采用细菌 16S rRNA 基因通用引物。

PCR 反应体系(25 μ L): 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μ L, 引物 27F 和 1492R (10 μ mol/L) 各 1 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.3 μ L, DNA 模板 1 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 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取 2.5 μ L PCR 产物, 点样于 1.5% 的琼脂糖凝胶中, 电泳 40 min 后用凝胶成像仪观察电泳结果。检测出有条带的菌株 PCR 产物送至铂尚生物技术有限公司进行测序。将各菌株的 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 (方法为 Neighbour-Joining, Bootstrap 值取 1 000) 构建系统进化树。

1.2.3 耐盐特性测定

参照刘冰冰等耐盐特性测定方法, 将 16S rRNA 基因鉴定结果中所挑选的代表菌株分别接种于不同盐浓度的 LB 培养基上, 30 $^{\circ}$ C 倒置于恒温培养箱中, 培养 48 h 后观察菌株生长情况^[10]。

1.2.4 温度特性测定

根据 16S rRNA 基因鉴定结果挑选出代表菌株, 参照谢永丽等温度特性测定的方法加以改进^[11], 将代表菌株接种于 LB 培养基上, 分别倒置于 4、15、20、25、30、45 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中, 培养 48 h 后观察菌株的生长情况(4 $^{\circ}$ C 和 15 $^{\circ}$ C 需培养 5 d 后观察菌株的生长情况)。

1.2.5 pH 耐受特性测定

参照谢永丽等 pH 耐受特性测定的方法加以改进^[11], 将 16S rRNA 基因鉴定结果中挑选出的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 48 h 后观察菌株的生长情况。

1.2.6 生理生化特性测定

测定方法按照 API 50CH 碳水化合物鉴定试剂条的说明书进行, 先制备菌悬液, 然后将菌悬液加到试剂条上的 50 个微生化管中, 最后用无菌液体石蜡封管静置 30 $^{\circ}$ C 培养, 24 h 和 48 h 各观察

1 次结果。试剂条变为黄色(25 号管变为黑色)为阳性反应, 变为绿色(25 号管除外)为弱阳性反应, 不变色为阴性反应, 以 48 h 观察到的结果作为最终结果。参照 API 20E 的鉴定试剂说明书进行, 将菌悬液加入到试条的小管内。在试验 Hydrolysis ADH (Arginine dihydrolase)、LDC (Lysine decarboxylase)、ODC (Ornithine decarboxylase)、H₂S (Hydrogen sulfide)和 URE (Urease)小杯内加入矿物油以形成厌氧环境, 30 $^{\circ}$ C 培养 18–24 h; 参考说明表判读其结果。根据生理生化反应结果统计表, 将阳性记“1”, 阴性记“0”生成新表格, 利用 DPS (Data Processing System) 软件进行分析, 可变类平均法计算菌株间的欧氏距离进行阳性率系统聚类分析^[12]。其中指标阳性率平均值为 1 时, 表明菌株多个生理生化指标阳性率为 100%, 为 0 时阴性率为 100%。

2 结果与分析

2.1 芽胞杆菌资源的分离及鉴定

通过稀释涂布法从四川海螺沟冰川土壤中共分离到 44 株不同菌落形态的菌株, 其中, 30 $^{\circ}$ C 条件下培养获得 33 株(FJAT-46639–FJAT-46671), 在 4 $^{\circ}$ C 下分离到 11 株(FJAT-46673–FJAT-46683)。它们的菌落较小, 分离菌株菌落平均直径大小约为 1–2 mm, 颜色大多为乳白色, 少数为黄色, 圆形不透明, 表面光滑湿润或粘稠, 边缘较整齐, 多数隆起, 少数为扁平。菌落形态见图 1。

16S rRNA 基因鉴定结果表明, 44 株分离菌中仅 36 株为芽胞杆菌, 隶属于 4 个属的 19 个种(表 1), 分别为芽胞杆菌属(*Bacillus*, 11 种, 24 株)、类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*, 2 种, 3 株)、短芽胞杆菌属(*Brevibacillus*, 4 种, 5 株)和赖氨酸芽胞杆菌属(*Lysinibacillus*, 2 种, 4 株), 其中以芽胞杆菌属(*Bacillus*)为优势属, 占总体的 67%。本实验分离获得的 4 个属 19 种芽胞杆菌中, 以芽胞杆菌属(*Bacillus*)、短芽胞杆菌属(*Brevibacillus*)和类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*) 3 个属分布较广泛。

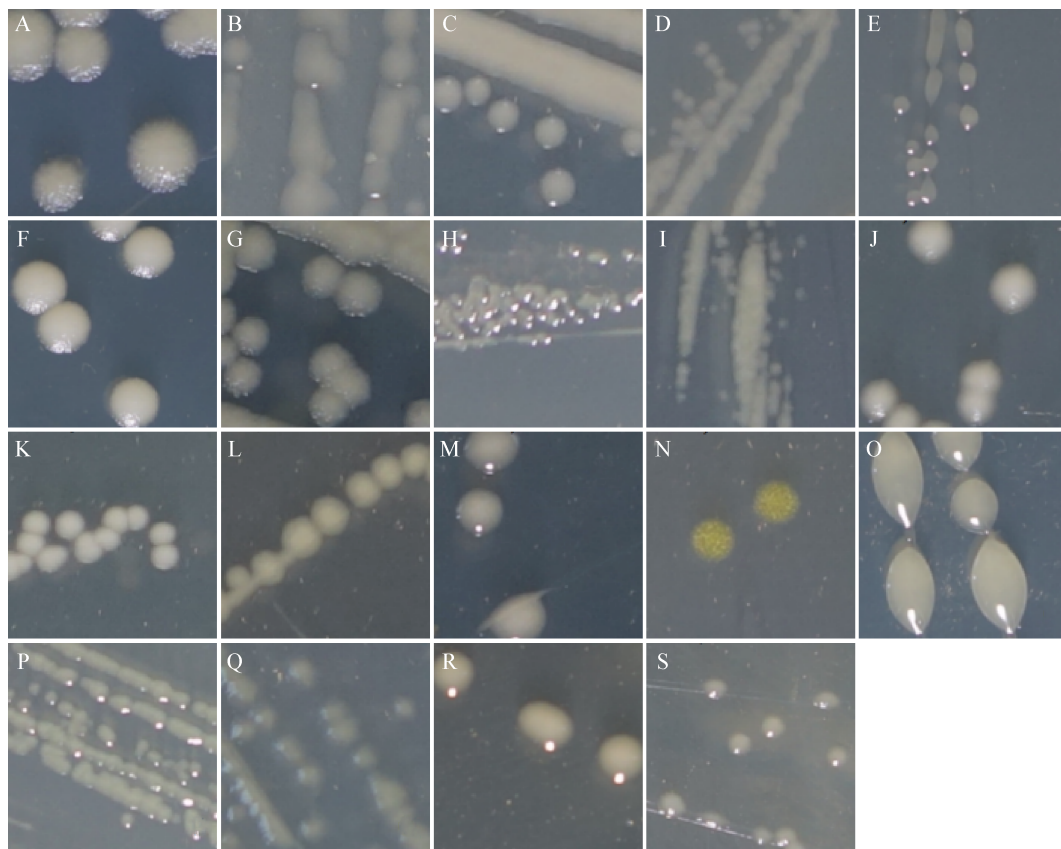


图 1 芽胞杆菌的菌落形态

Figure 1 Morphology of some colonies of *Bacillus*-like species

Note: A: *Bacillus megaterium* FJAT-46639; B: *Paenibacillus provencensis* FJAT-46641; C: *Lysinibacillus fusiformis* FJAT-46642; D: *Brevibacillus reuszeri* FJAT-46643; E: *Bacillus siamensis* FJAT-46644; F: *Bacillus aryabhattai* FJAT-46645; G: *Bacillus thuringiensis* FJAT-46646; H: *Brevibacillus fluminis* FJAT-46648; I: *Brevibacillus agri* FJAT-46651; J: *Bacillus weihenstephanensis* FJAT-46654; K: *Bacillus cytotoxicus* FJAT-46655; L: *Bacillus nealsonii* FJAT-46656; M: *Bacillus simplex* FJAT-46657; N: *Bacillus indicus* FJAT-46658; O: *Bacillus licheniformis* FJAT-46659; P: *Brevibacillus brevis* FJAT-46662; Q: *Paenibacillus amylolyticus* FJAT-46664; R: *Bacillus psychrosaccharolyticus* FJAT-46679; S: *Bacillus cecembensis* FJAT-46680.

2.2 芽胞杆菌资源的系统发育分析

由图 2 可知, 19 种芽胞杆菌菌株可分为 4 大类群: 第 I 类群由 11 种芽胞杆菌组成, 皆为芽胞杆菌属, 分别为巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*)、阿氏芽胞杆菌 (*Bacillus aryabhattai*)、苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、暹罗芽胞杆菌 (*Bacillus siamensis*)、韦氏芽胞杆菌 (*Bacillus weihenstephanensis*)、简单芽胞杆菌 (*Bacillus simplex*)、印度芽胞杆菌 (*Bacillus indicus*)、冷解糖芽胞杆菌 (*Bacillus psychrosaccharolyticus*)、地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、尼氏芽胞杆菌 (*Bacillus nealsonii*) 和细胞毒素芽胞杆菌 (*Bacillus cytotoxicus*); 第 II 类

群为赖氨酸芽胞杆菌属, 包含纺锤形赖氨酸芽胞杆菌 (*Lysinibacillus fusiformis*) 和科研中心芽胞杆菌 (*Bacillus cecembensis*); 第 III 类群为短芽胞杆菌属, 包含短短芽胞杆菌 (*Brevibacillus brevis*)、茹氏短芽胞杆菌 (*Brevibacillus reuszeri*)、流水短芽胞杆菌 (*Brevibacillus fluminis*)、和土壤短芽胞杆菌 (*Brevibacillus agri*) 4 个种; 第 IV 类群为类芽胞杆菌属 (*Paenibacillus*), 由普罗旺斯类芽胞杆菌 (*Paenibacillus provencensis*) 和解淀粉类芽胞杆菌组成, 其中包含了一株潜在新种 FJAT-46664, 它与解淀粉类芽胞杆菌的模式菌 16S rRNA 基因序列相似性最高, 达 98.5%, 低于种的界限阈值 98.65%。

表 1 海螺沟冰川土壤芽胞杆菌 16S rRNA 基因鉴定

Table 1 Identification of *Bacillus*-like species isolated from Hailuoguo glacier soil samples based on 16S rRNA gene sequences

菌株编号 Strain No.	学名 Scientific name	相似性 Similarity (%)	序列号 Accession No.
FJAT-46639	巨大芽胞杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	100.0	MF322893
FJAT-46641	普罗旺斯类芽胞杆菌 <i>Paenibacillus provencensis</i>	99.8	MF322892
FJAT-46642	纺锤形赖氨酸芽胞杆菌 <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	100.0	MF322891
FJAT-46643	茹氏短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus reuszeri</i>	99.8	MF322890
FJAT-46644	暹罗芽胞杆菌 <i>Bacillus siamensis</i>	100.0	MF322889
FJAT-46645	阿氏芽胞杆菌 <i>Bacillus aryabhattai</i>	100.0	MF322888
FJAT-46646	苏云金芽胞杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	99.9	MF322887
FJAT-46648	流水短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus fluminis</i>	99.9	MF322886
FJAT-46651	土壤短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus agri</i>	99.4	MF322885
FJAT-46654	韦氏芽胞杆菌 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99.6	MF322884
FJAT-46655	细胞毒素芽胞杆菌 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	100.0	MF322883
FJAT-46656	尼氏芽胞杆菌 <i>Bacillus nealsonii</i>	98.9	MF322882
FJAT-46657	简单芽胞杆菌 <i>Bacillus simplex</i>	99.3	MF322881
FJAT-46658	印度芽胞杆菌 <i>Bacillus indicus</i>	100.0	MF322880
FJAT-46659	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	100.0	MF322879
FJAT-46662	短短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus brevis</i>	99.0	MF322878
FJAT-46664	解淀粉类芽胞杆菌 <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	98.5	MF322877
FJAT-46679	冷解糖芽胞杆菌 <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	99.8	MF322876
FJAT-46680	科研中心芽胞杆菌 <i>Bacillus cecembensis</i>	99.5	MF322875

2.3 芽胞杆菌资源的培养特性分析

根据 16S rRNA 基因序列鉴定结果, 从中挑选出 19 株具有不同 16S rRNA 基因序列的芽胞杆菌进行 pH、温度和 NaCl 培养特性研究。由表 2 可知, 菌株 FJAT-46639、FJAT-46645 和 FJAT-46659 的耐盐范围最大在 0–10%, 最适盐浓度为 1%–3%, 仅有 1 株菌只在 3% 盐浓度生长, 7 株可以在无盐的条件下生长。64% 的菌株 pH 耐受范围在 5.7–11.0, 仅 FJAT-46648 菌株的 pH 耐受范围为 5.7–8.0, FJAT-46658 和 FJAT-46679 菌株在 pH 7.0 及以下不生长, 15% 的菌株在 pH 10.0 及以上不生长, 而菌株 FJAT-46643 的 pH 耐受范围在 5.7–10.0, 大部分菌株最适 pH 在 7.0。温度特性实验结果表明, 约 52.6% 的菌株能在 50 °C 生长, 菌株 FJAT-46648 和 FJAT-46651 的生长温度范围只在 30–45 °C; 只有

FJAT-46657、FJAT-46679 和 FJAT-46680 这 3 株菌能在 4 °C 下生长, 其余菌株在 4 °C 下均不生长。大部分菌株在 30 °C 条件下生长较好。

2.4 芽胞杆菌资源的生理生化特性分析

根据生理生化实验结果, 采用类平均法和欧氏距离模型进行聚类分析(图 3)。当欧氏距离为 5 时, 可分为 3 组。第一组为普罗旺斯类芽胞杆菌(*Paenibacillus provencensis*)、暹罗芽胞杆菌(*B. siamensis*)、巨大芽胞杆菌(*B. megaterium*)、阿氏芽胞杆菌(*B. aryabhattai*)、尼氏芽胞杆菌(*B. nealsonii*)、地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*)和解淀粉类芽胞杆菌(*Paenibacillus amylolyticus*)共 7 种; 第二组包括 4 种, 分别为纺锤形赖氨酸芽胞杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*)、短短芽胞杆菌(*Brevibacillus brevis*)、茹氏短芽胞杆(*Brevibacillus*

reuszeri)和科研中心芽胞杆菌(*B. cecembensis*) ; 第三组由苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*)、韦氏芽胞杆菌(*B. weihenstephanensis*)、简单芽胞杆菌(*B. simplex*)、印度芽胞杆菌(*B. indicus*)、冷解糖芽胞杆菌(*B. psychrosaccharolyticus*)和细胞毒素芽胞

杆菌(*B. cytotoxicus*) 6 种组成。

根据上述欧氏距离聚类分析的结果,进行了各组芽胞杆菌生理生化指标阳性率的分析(表 3)。从各组到中心距离的值可以得出这 3 组之间的差距比较大,第 3 组生理生化指标阳性率值到中心的距离

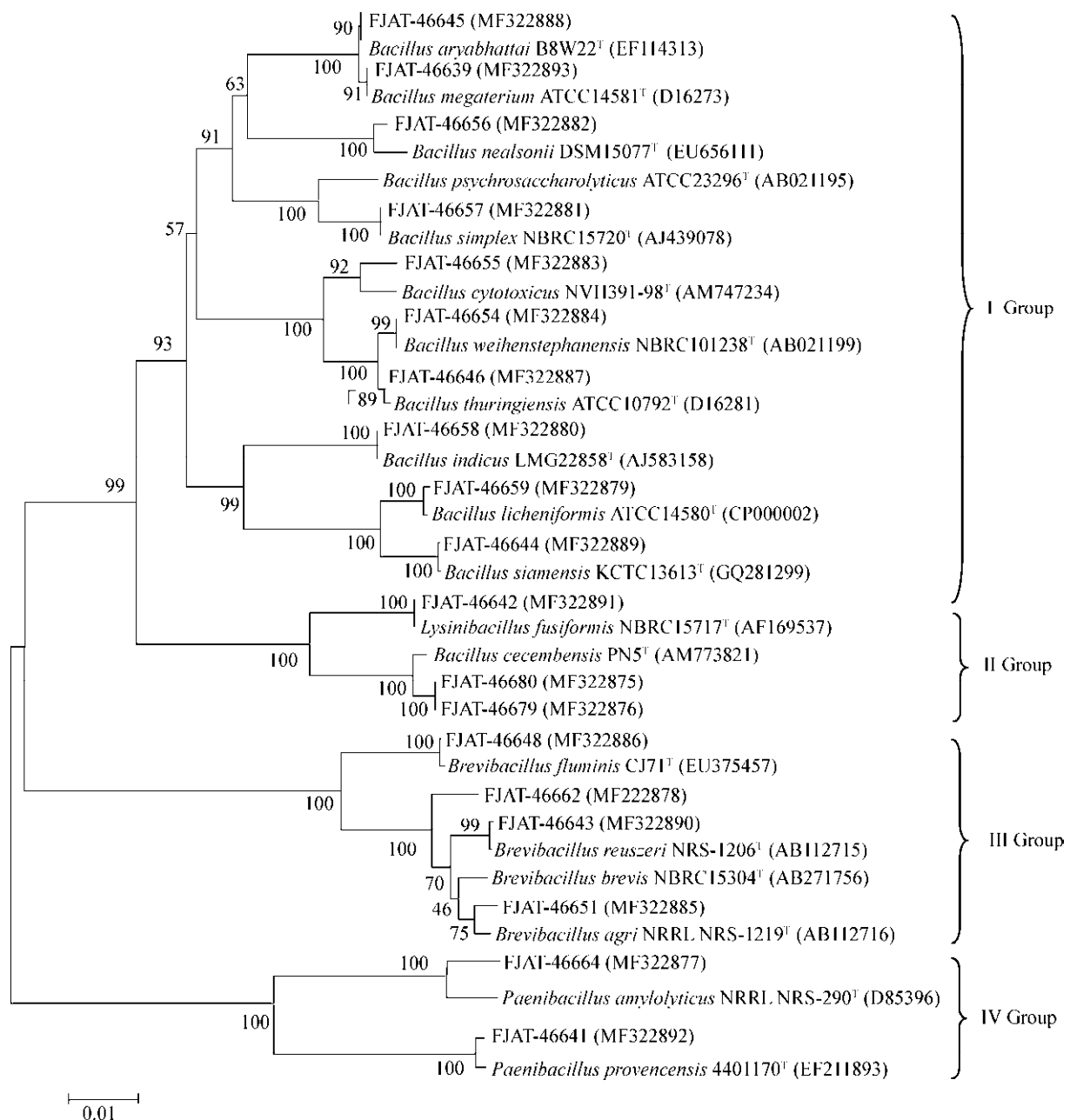


图 2 海螺沟冰川土样中 19 株芽胞杆菌的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic analysis of 19 *Bacillus*-like species from soil samples in Hailuoguo Sichuan Province

表 2 芽胞杆菌 pH、温度及 NaCl 生长特性
Table 2 The growth characteristics of *Bacillus*-like species in different conditions of pH, temperature and NaCl

菌株编号 Strain No.	学名 Scientific name	pH 范围(最适 pH) pH range (Optimum pH)	温度范围(最适温度) Temperature range (°C) (Optimum temperature)	NaCl 含量(最适) Content of NaCl (%) (Optimum NaCl)
FJAT-46639	巨大芽胞杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	5.7–11.0 (5.7)	15–50 (45)	0–10 (1–3)
FJAT-46641	普罗旺斯类芽胞杆菌 <i>Paenibacillus provencensis</i>	5.7–11.0 (7.0)	15–50 (30)	1–3 (1)
FJAT-46642	纺锤形赖氨酸芽胞杆菌 <i>Lysinibacillus fusiformis</i>	5.7–11.0 (7.0)	15–50 (30)	1–5 (1)
FJAT-46643	茹氏短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus reuszeri</i>	5.7–10.0 (7.0)	30–50 (45)	1
FJAT-46644	暹罗芽胞杆菌 <i>Bacillus siamensis</i>	5.7–9.0 (7.0)	30–50 (45)	3–5
FJAT-46645	阿氏芽胞杆菌 <i>Bacillus aryabhattai</i>	5.7–11.0 (8.0)	15–50 (30)	0–10 (1)
FJAT-46646	苏云金芽胞杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	5.7–11.0 (7.0)	15–50 (30)	1–7 (1)
FJAT-46648	流水短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus fluminis</i>	5.7–8.0 (7.0)	30–45 (30)	1
FJAT-46651	土壤短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus agri</i>	5.7–9.0 (8.0)	30–45 (45)	1
FJAT-46654	韦氏芽胞杆菌 <i>Bacillus weihenstephanensis</i>	5.7–11.0 (5.7)	15–30 (15)	1–5 (1)
FJAT-46655	细胞毒素芽胞杆菌 <i>Bacillus cytotoxicus</i>	5.7–11.0 (5.7)	20–30 (30)	1–3
FJAT-46656	尼氏芽胞杆菌 <i>Bacillus nealsonii</i>	5.7–11.0 (8.0)	15–45 (30)	1–5 (1–3)
FJAT-46657	简单芽胞杆菌 <i>Bacillus simplex</i>	5.7–11.0 (8.0)	4–30 (15)	1–7 (1)
FJAT-46658	印度芽胞杆菌 <i>Bacillus indicus</i>	7.0–11.0 (8.0–9.0)	15–50 (30)	0–7 (1)
FJAT-46659	地衣芽胞杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>	5.7–11.0 (7.0)	20–50 (45)	0–10 (0–3)
FJAT-46662	短短芽胞杆菌 <i>Brevibacillus brevis</i>	5.7–9.0 (8.0)	20–50 (45)	0–1
FJAT-46664	解淀粉类芽胞杆菌 <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	5.7–11.0 (8.0)	15–30 (30)	0–5 (0–1)
FJAT-46679	冷解糖芽胞杆菌 <i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>	7.0–11.0 (8.0)	4–30 (15)	3
FJAT-46680	科研中心芽胞杆菌 <i>Bacillus cecembensis</i>	5.7–11.0 (10.0)	4–30 (30)	0–3 (0–1)

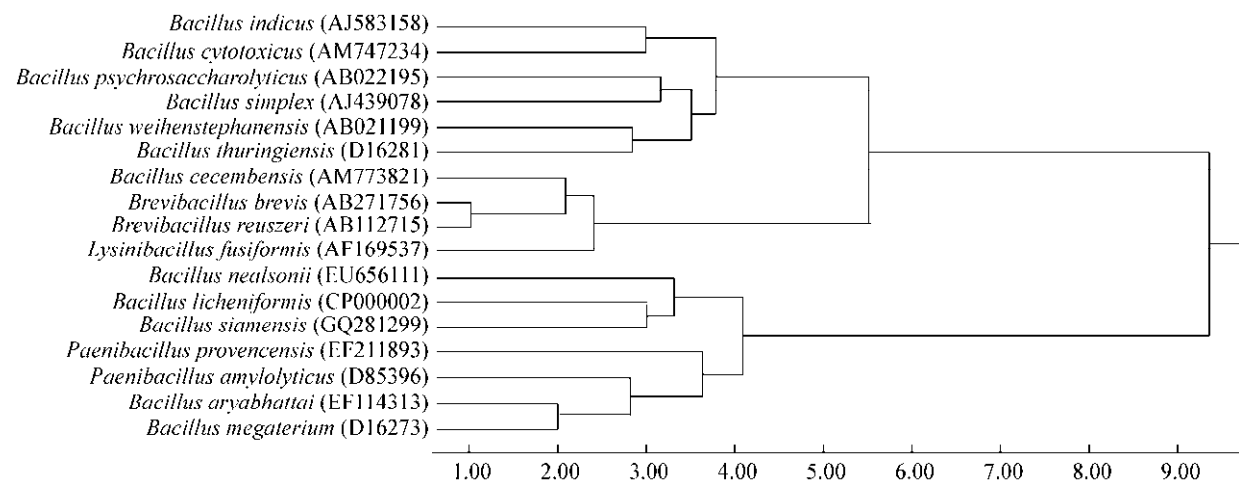


图 3 用可变类平均法得到的树状谱
Figure 3 The dendrogram obtained by the group average method
注：图中数字为欧式距离。
Note: The number is Euclidean distance in the picture.

表 3 3 组芽胞杆菌生理生化指标阳性率平均值

Table 3 Three groups of *Bacillus*-like for positive rate average of physiological and biochemical indexes

组别样本号 Sample	第 1 组 7 个样本 Seven samples of the first group	第 2 组 4 个样本 Four samples of the second group	第 3 组 6 个样本 Six samples of the third group
甘油 Glycerol	0.86	0.00	0.17
赤藓醇 Erythritol	0.14	0.00	0.00
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	1.00	0.00	0.00
核糖 Ribose	1.00	0.00	0.5
D-木糖 D-Xylose	1.00	0.00	0.17
半乳糖 Galactose	0.71	0.00	0.00
葡萄糖 Glucose	1.00	0.00	1.00
果糖 Fructose	1.00	0.00	0.83
甘露糖 Mannose	0.57	0.00	0.50
山梨糖 Sorbose	0.14	0.00	0.00
鼠李糖 Rhamnose	0.14	0.00	0.00
肌醇 Inositol	0.29	0.00	0.33
甘露醇 Mannitol	0.86	0.25	0.17
山梨醇 Sorbitol	0.57	0.00	0.00
α -甲基-D-葡萄糖甙	0.43	0.00	0.17
α -Methyl-D-mannose glycosides			
N-乙酰-葡萄糖胺 N-Acetylglucosamine	0.86	0.25	0.67
苦杏仁甙 Amygdalin	1.00	0.00	0.00
熊果甙 Arbutin	0.86	0.00	0.17
七叶灵 Esculin	1.00	0.00	0.67
柳醇 Saligenin	0.86	0.00	0.50
纤维二糖 Cellobiose	0.86	0.00	0.67
麦芽糖 Maltose	0.86	0.00	0.83
乳糖 Lactose	0.43	0.00	0.00
蜜二糖 D-Melibiose	0.71	0.00	0.17
蔗糖 Sucrose	1.00	0.00	0.33
海藻糖 Trehalose	0.86	0.00	0.83
松叁糖 Melizitose	0.29	0.00	0.00
棉子糖 Raffinose	0.86	0.00	0.33
淀粉 Starch	1.00	0.00	0.50
肝糖 Glycogen	0.86	0.00	0.50
龙胆二糖 Gentiobiose	0.86	0.00	0.00
D-松二糖 D-Turanose	0.57	0.00	0.00
葡萄糖酸盐 Gluconate	0.29	0.00	0.33
邻硝基苯-半乳糖苷	0.71	0.25	0.33
2-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside			
精氨酸 Arginine	0.14	0.25	0.33
柠檬酸钠 Sodium citrate	0.14	0.25	0.17
脲素 Carbamide	0.00	0.50	0.00
Kohn 明胶 Gelatin	0.43	0.75	1.00
到中心距离 Distance of center	RMSTD=1.345 1	RMSTD=7.817 3	RMSTD=1.362 1

RMSTD=1.362 1, 约等于第 1 组, 小于第 2 组。从表 3 可知, 第 1 组和第 3 组均可以利用葡萄糖, 第 2 组则均无法利用葡萄糖; 对甘油的利用程度来看, 第 1 组中能利用甘油的芽胞杆菌最多; 第 1 组的样本均可以水解七叶灵, 第 3 组中有部分菌可以水解七叶灵, 而第 2 组均不能水解七叶灵; 仅第 1 组中的芽胞杆菌能分解半乳糖; 这 3 组中均有菌株能利用明胶, 而第 2 组中的全部都能利用明胶。除此之外, 其组内的各菌种之间也是有较大的差距的。第 1 组中, 从均值上看, 不是所有的菌株都能利用同一种物质但它们都可以利用核糖、七叶灵、葡萄糖、果糖、蔗糖和淀粉等; 而第 3 组的仅能共同利用葡萄糖。

根据代表芽胞杆菌的生理生化结果阳性统计表, 对其进行聚类分析, 利用 Wilks 统计量分析生理生化反应在不同芽胞杆菌间的差异。从表 4 可知, 有大于 30% 的菌株在生理生化反应中, 其物质

阳性率占 60% 以上, 其中最高的为尼氏芽胞杆菌(*B. nealsonii*) FJAT-46656 为 81.58%, 而茹氏短芽胞杆菌(*Brevibacillus reuszeri*) FJAT-46643 和科研中心芽胞杆菌(*B. cecembensis*) FJAT-46680 的物质阳性率仅占 5.26%。

3 讨论与结论

冰川冰芯、融水及冻土等低温环境中, 可培养细菌主要包括 6 个系统发育类群: α -变形菌门、 β -变形菌门、 γ -变形菌门、拟杆菌、高 G+C% 和低 G+C% 含量革兰氏阳性菌, 至少有 30 多个属^[13-15]。本文研究结果表明, 四川海螺沟冰川获得的芽胞杆菌隶属于 4 个属 19 个种, 芽胞杆菌属(*Bacillus*) 11 个种、类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*) 2 个种、短芽胞杆菌属(*Brevibacillus*) 4 个种、赖氨酸芽胞杆菌属(*Lysinibacillus*) 2 个种, 其中芽胞杆菌属为优势属。

表 4 芽胞杆菌生理生化指标阳性率统计

Table 4 Statistics of positive rate of physiological and biochemical indexes of *Bacillus*-like

变量 Variables	样本数 Sample	均值 Average value	方差 Variance	标准差 Standard deviation	Wilks	P value
FJAT-46639	38	0.657 9	0.231 2	0.480 8	0.600 1	0
FJAT-46641	38	0.394 7	0.245 4	0.495 4	0.621 1	0
FJAT-46642	38	0.131 6	0.117 4	0.342 6	0.400 3	0
FJAT-46643	38	0.052 6	0.051 2	0.226 3	0.237 2	0
FJAT-46644	38	0.789 5	0.170 7	0.413 2	0.502 4	0
FJAT-46645	38	0.657 9	0.231 2	0.480 8	0.600 1	0
FJAT-46646	38	0.368 4	0.239 0	0.488 9	0.611 7	0
FJAT-46654	38	0.368 4	0.239 0	0.488 9	0.611 7	0
FJAT-46655	38	0.263 2	0.199 1	0.446 3	0.550 3	0
FJAT-46656	38	0.815 8	0.154 3	0.392 9	0.473 0	0
FJAT-46657	38	0.236 8	0.185 6	0.430 9	0.528 0	0
FJAT-46658	38	0.394 7	0.245 4	0.495 4	0.621 1	0
FJAT-46659	38	0.710 5	0.211 2	0.459 6	0.569 6	0
FJAT-46662	38	0.026 3	0.026 3	0.162 2	0.152 4	0
FJAT-46664	38	0.605 3	0.245 4	0.495 4	0.621 1	0
FJAT-46679	38	0.289 5	0.211 2	0.459 6	0.569 6	0
FJAT-46680	38	0.052 6	0.051 2	0.226 3	0.237 2	0

我国地域辽阔, 拥有丰富的冰川类型, 包括大陆性冰川、亚大陆冰川和海洋型冰川, 而且冰川分布的范围广, 资源丰富, 从低纬度到高纬度地区都有分布^[16-17]。在新疆、青海、甘肃、四川、云南和西藏等地区的冰川环境中潜藏着丰富的芽胞杆菌资源。本文从四川海螺沟冰川土壤样品中获得的 19 种芽胞杆菌种类, 与其他冰川如玉珠峰冰川^[3]、祁连山冰川^[18]、扎当冰川^[3]、慕士塔格峰洋布拉克冰川^[4]、喀拉昆仑南部熊彩岗日地区冰川^[4]、天山冰芯^[19]、东天山地区冰川^[20]、卓奥友地区冰川^[20]、马兰冰芯^[21]、喀纳斯湖区^[22]、玉龙雪山冰川^[23]、东绒布冰川^[24]、西昆仑山^[25]及西昆仑崇测冰帽^[26]等进行比较分析, 其中解淀粉类芽胞杆菌(*Paenibacillus amylolyticus*) 在卓奥友地区冰川^[20]、喀纳斯湖区^[22]和玉龙雪山冰川^[23]中均有报道; 在西昆仑崇测冰帽^[26]也有发现纺锤形赖氨酸芽胞杆菌(*Lysinibacillus fusiformis*); 韦氏芽胞杆菌(*B. weihenstephanensis*) 也分布在慕士塔格峰洋布拉克冰川^[4]; 在珠穆朗玛峰地区的东绒布冰川分离到土壤短芽胞杆菌(*Brevibacillus agri*)^[24]; 在西昆仑山 2 个不同海拔位点上分离获得地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*) 和简单芽胞杆菌(*B. simplex*)^[25], 由此可知冰川地区的芽胞杆菌资源具有一定相似性。此外, 在四川海螺沟冰川发现的普罗旺斯类芽胞杆菌(*Paenibacillus provencensis*)、暹罗芽胞杆菌(*B. siamensis*)、巨大芽胞杆菌(*B. megaterium*)、阿氏芽胞杆菌(*B. aryabhattai*)、尼氏芽胞杆菌(*B. nealsonii*)、短短芽胞杆菌(*Brevibacillus brevis*)、茹氏短芽胞杆菌(*Brevibacillus reuszeri*)、科研中心芽胞杆菌(*B. cecembensis*)、苏云金芽胞杆菌(*B. thuringiensis*)、印度芽胞杆菌(*B. indicus*)、冷解糖芽胞杆菌(*B. psychrosaccharolyticus*)、流水短芽胞杆菌(*Brevibacillus fluminis*) 和细胞毒素芽胞杆菌(*B. cytotoxicus*) 这 13 株菌在国内其他冰川中鲜见报道, 推测是地方特有类群。这是否与其所

处冰川的地理格局及气候因素有关, 尚需进一步探讨。综上表明四川海螺沟冰川的土壤中分布着独特的芽胞杆菌群落结构和多样性。

四川海螺沟冰川土样中分离的芽胞杆菌具有较广的温度适应性, 多数菌株的生长温度范围为 15–50 °C, 能在 50 °C 下存活的菌株有 10 株, 说明有一半的芽胞杆菌对外界高温具有一定的耐受能力, 且有 3 株菌能在 4 °C 下生长。对 19 株代表芽胞杆菌进行 pH 耐受特性实验, 筛选得到能在 pH 范围为 5.7–11.0 生长的芽胞杆菌有 12 株, 占代表芽胞杆菌总数的 64%, 说明有半数以上的芽胞杆菌有较广的 pH 耐受范围。从实验结果得出相同属不同种芽胞杆菌的 pH 耐受性相似, 不同属的芽胞杆菌之间的 pH 耐受性有一定的差异。而芽胞杆菌耐盐特性实验得出, 芽胞杆菌的耐盐范围最大在 0–10.0%, 有的耐盐范围仅在 0–1.0%, 说明芽胞杆菌之间的耐盐度差异较大。

法国梅里埃(BioMerieux, SA) API 微生物鉴定方法简单、快速和结果明显。本研究中选用了鉴定芽胞杆菌的 API 50CH 和 API 20E 试剂条检测供试菌株, 根据反应结果统计表进行了欧氏距离等方法统计, 结果表明四川海螺沟冰川芽胞杆菌具有多样性的生理生化特性, 其中不同物质的利用率差异较大, 明胶的利用率最高, 鼠李糖、山梨醇等的利用率低; 同时发现同属不同种菌株的生理生化特征具有一定的差异, 如尼氏芽胞杆菌 FJAT-46656 能利用 80% 以上的物质, 而茹氏短芽胞杆菌 FJAT-46643 的物质阳性率仅达到 5.26%, 这可能与芽胞杆菌对环境的适应性及其本身的性质有一定的相关性。

Sun 等报道了细菌基因组内的非均匀性引起 16S rRNA 基因对原核生物多样性过度估计, 细菌不同区域的 16S rRNA 基因的多样性误差可能影响种类的鉴定^[27]。文中 16S rRNA 基因作为芽胞杆菌种类鉴定的依据, 仅为种类资源调查的初筛手段,

同时比对序列的相似性控制在 99.0% 以上, 对于每一个芽胞杆菌种类的最后确定还进行了相应的全基因组、细胞壁、生理生化特性、脂肪酸组、甚至物质组的实验分析。本文通过 16S rRNA 基因和生理生化特性实验初步研究了四川海螺沟冰川芽胞杆菌的分布, 为后续进一步开发利用这些芽胞杆菌资源提供了理论基础。

REFERENCES

- [1] Liu GH, Liu B, Wang JP, et al. Advances in taxonomy and application of *Bacillus*[J]. Microbiology China, 2017, 44(4): 949-958 (in Chinese)
刘国红, 刘波, 王阶平, 等. 芽胞杆菌分类与应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(4): 949-958
- [2] Zhang SH, Baoge RL, Li ZG, et al. Study of bacterial diversity in glaciers of Xiongcaigangri region of South Karakoram[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2016, 50(2): 275-281 (in Chinese)
张淑红, 包格日乐, 李治国, 等. 喀拉昆仑南部熊彩岗日地区冰川细菌多样性研究[J]. 河南农业大学学报, 2016, 50(2): 275-281
- [3] Xing TT, Liu YQ, Wang NL, et al. The physiological characteristics of culturable bacteria in Muztag, Yuzhufeng and Zadang glaciers on Tibetan Plateau, China[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2016, 38(2): 528-538 (in Chinese)
邢婷婷, 刘勇勤, 王宁练, 等. 青藏高原木孜塔格冰川、玉珠峰冰川及扎当冰川可培养细菌的生理特征[J]. 冰川冻土, 2016, 38(2): 528-538
- [4] Li MY, Wang JL, Gulbahar S. Culturable bacterial diversity in snow, ice and meltwater of the Yangbark Glacier, Muztag Ata[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2015, 37(6): 1634-1641 (in Chinese)
李明源, 王继莲, 古丽巴哈尔·萨吾提. 新疆东帕米尔高原慕士塔格峰洋布拉克冰川雪冰及融水中可培养细菌多样性分析[J]. 冰川冻土, 2015, 37(6): 1634-1641
- [5] Rondón J, Gómez W, Ball MM, et al. Diversity of culturable bacteria recovered from Pico Bolívar's glacial and subglacial environments, at 4 950 m, in Venezuelan tropical Andes[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2016, 62(11): 904-917
- [6] Singh P, Singh SM, Roy U. Taxonomic characterization and the bio-potential of bacteria isolated from glacier ice cores in the High Arctic[J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(3): 275-285
- [7] Liu Q, Zhou YG, Xin YH. High diversity and distinctive community structure of bacteria on glaciers in China revealed by 454 pyrosequencing[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2015, 38(8): 578-585
- [8] Seok YJ, Song EJ, Cha IT, et al. Microbial community of the arctic soil from the glacier foreland of Midtre Lovénbreen in Svalbard by metagenome analysis[J]. Microbiology and Biotechnology Letters, 2016, 44(2): 171-179
- [9] Yang DD, Luo J, She J, et al. Dynamics of vegetation biomass along the chronosequence in Hailuoguo Glacier retreated area, Mt. Gongga[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2015, 24(11): 1843-1850 (in Chinese)
杨丹丹, 罗辑, 余佳, 等. 贡嘎山海螺沟冰川退缩区原生演替序列植被生物量动态[J]. 生态环境学报, 2015, 24(11): 1843-1850
- [10] 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
- [11] Xie YL, D'Ovidio R, Masci S, et al. Molecular identification of cellulose-degrading bio-control *Bacillus* strains and their stress-resistance and growth-promoting characteristics[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 348-357 (in Chinese)
谢永丽, D'Ovidio R, Masci S, 等. 几株解纤维素生防芽胞杆菌的分子鉴定及其抗逆促生特性分析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 348-357
- [12] 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
- [13] Wu XK, Mao WL, Tai XS, et al. Progress in studies of microbial ecology in glacier foreland[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2013, 35(1): 217-223 (in Chinese)
伍修锐, 毛文梁, 台喜生, 等. 冰川前沿裸露地微生物生态学研究进展[J]. 冰川冻土, 2013, 35(1): 217-223
- [14] Miteva VI, Sheridan PP, Brenchley JE. Phylogenetic and physiological diversity of microorganisms isolated from a deep Greenland glacier ice core[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(1): 202-213
- [15] Zeng YX, Yan M, Yu Y, et al. Diversity of bacteria in surface ice of Austre Lovénbreen glacier, Svalbard[J]. Archives of Microbiology, 2013, 195(5): 313-322
- [16] Zhang GF, Li ZQ, Wang WB, et al. Change processes and characteristics of mass balance of the Ürümqi Glacier No. 1 at the headwaters of the Ürümqi River, Tianshan Mountains, during 1959-2009[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2012, 34(6): 1301-1309 (in Chinese)
张国飞, 李忠勤, 王文彬, 等. 天山乌鲁木齐河源 1 号冰川 1959-2009 年物质平衡变化过程及特征研究[J]. 冰川冻土, 2012, 34(6): 1301-1309
- [17] Sun WJ, Qin X, Ren JW, et al. Surface energy balance in the accumulation zone of the Laohugou Glacier No. 12 in the Qilian Mountains during ablation period[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2011, 33(1): 38-46 (in Chinese)

- 孙维君, 秦翔, 任贾文, 等. 祁连山老虎沟 12 号冰川积累区消融期能量平衡特征[J]. 冰川冻土, 2011, 33(1): 38-46
- [18] Xie J, Wang NL, Chen L, et al. Bacterial diversity recovered from Qiyi Glacier and Runoff, Qilian Mts.[J]. Environmental Science, 2009, 30(9): 2735-2740 (in Chinese)
谢君, 王宁练, 陈亮, 等. 祁连山七一冰川及融水中细菌多样性的研究[J]. 环境科学, 2009, 30(9): 2735-2740
- [19] Lin J, Zhang XF, An LZ, et al. Study of the diversity and depth distribution of bacteria isolated from the core of the Glacier No. 1 at the headwaters of the Ürümqi River, Tianshan Mountains[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2008, 30(6): 1033-1040 (in Chinese)
林娟, 张新芳, 安黎哲, 等. 天山冰芯细菌多样性研究[J]. 冰川冻土, 2008, 30(6): 1033-1040
- [20] Ma XJ, Liu W, Hou SG, et al. Culturable bacteria in snow pits of different type glaciers: diversity and relationship with environment[J]. Journal of Glaciology and Geocryology, 2009, 31(3): 483-489 (in Chinese)
马晓军, 刘炜, 侯书贵, 等. 不同类型冰川雪中可培养细菌多样性变化及其与环境因子关系研究[J]. 冰川冻土, 2009, 31(3): 483-489
- [21] Zhang XJ, Yao TD, Ma XJ, et al. Analysis of the characteristics of microorganisms packed in the ice core of Malan Glacier, Tibet, China[J]. Science in China Series D: Earth Sciences, 2001, 44(S1): 369-374 (in Chinese)
张晓君, 姚檀栋, 马晓军, 等. 马兰冰川: 一支深冰芯中微生物特征的分析[J]. 中国科学(D 辑), 2001, 31(增刊): 295-299
- [22] Fang SJ, Chang W, Wang W, et al. Preliminary studies on diversity of psychrotolerant bacteria in Kanas Lake Spot and No. 1 Glacier in Xinjiang[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2009, 46(1): 59-62 (in Chinese)
房世杰, 常玮, 王伟, 等. 新疆喀纳斯湖区、一号冰川耐低温细菌多样性研究初报[J]. 新疆农业科学, 2009, 46(1): 59-62
- [23] Ma XJ, Liu W, Hou SG, et al. Bacterial diversity and community at Yulong Mountains and their relationship to climatic and environmental changes[J]. Journal of Lanzhou University (Natural Sciences), 2009, 45(6): 94-100 (in Chinese)
马晓军, 刘炜, 侯书贵, 等. 玉龙雪山冰川雪坑中细菌多样性群落结构及其与气候环境的关系[J]. 兰州大学学报: 自然科学版, 2009, 45(6): 94-100
- [24] Liu YQ, Yao TD, Kang SC, et al. Seasonal variation of snow microbial community structure in the East Rongbuk glacier, Mt. Everest[J]. Chinese Science Bulletin, 2006, 51(11): 1287-1296
刘勇勤, 姚檀栋, 康世昌, 等. 珠穆朗玛峰地区东绒布冰川冰雪微生物群落及其季节变化[J]. 科学通报, 2006, 51(11): 1287-1296
- [25] Maripat T, Abduwaly A, Zilaygul M, et al. Diversity of culturable bacteria isolated from two altitudes in the West Kunlun Mountains[J]. Arid Zone Research, 2011, 28(6): 1071-1080 (in Chinese)
玛丽帕·吐达洪, 阿不都外力·阿布都热依木, 孜来古丽·米吉提, 等. 西昆仑山 2 个海拔位点可培养细菌多样性分析[J]. 干旱区研究, 2011, 28(6): 1071-1080
- [26] Zhang SH, Hou SG, Baoge RL, et al. Difference of community structure among culturable bacteria in different glacial samples on Chongce Ice Cap[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(4): 708-718 (in Chinese)
张淑红, 侯书贵, 包格日乐, 等. 崇测冰帽不同的冰川样品可培养细菌群落结构差异[J]. 微生物学报, 2016, 56(4): 708-718
- [27] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of Prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969