

## 研究报告

## 稀释培养基结合添加诺氟沙星挖掘塔克拉玛干沙漠微生物资源

文凤, 刘淑芳, 吴佳敏, 吴思源, 扎米拉·吐尔江, 李丽霞, 罗晓霞, 夏占峰\*

塔里木大学生命科学与技术学院 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,  
新疆 阿拉尔 843300

文凤, 刘淑芳, 吴佳敏, 吴思源, 扎米拉·吐尔江, 李丽霞, 罗晓霞, 夏占峰. 稀释培养基结合添加诺氟沙星挖掘塔克拉玛干沙漠微生物资源[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2110-2126.

WEN Feng, LIU Shufang, WU Jiamin, WU Siyuan, Zhamila·Tuerjiang, LI Lixia, LUO Xiaoxia, XIA Zhanfeng. Diluted media supplemented with norfloxacin for mining of the microbial resources in the Taklimakan Desert[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2110-2126.

**摘要:** 【背景】塔克拉玛干沙漠属于典型高温干旱极端环境, 该地区的微生物经过长期的环境适应, 物种分布极具地域特色。【目的】获得塔克拉玛干沙漠极端环境可培养微生物资源, 并探索不同稀释浓度培养基结合添加诺氟沙星对塔克拉玛干沙漠微生物分离培养的影响。【方法】采用不同稀释浓度的高氏一号培养基、LB 培养基和 R2A 培养基, 添加诺氟沙星终浓度为 0.015  $\mu\text{g/mL}$ , 分离培养塔克拉玛干沙漠微生物并对分离株进行药敏试验。【结果】共分离鉴定 246 株菌, 分属于 4 个门 6 个纲 21 个目 29 个科 58 个属 221 个种。优势菌门为 *Firmicutes*、*Actinobacteria*; 优势菌纲为 *Bacilli*、*Actinomycetia*; 优势菌目为 *Bacillales*、*Streptomycetales*; 优势菌科为 *Bacillaceae*、*Streptomycetaceae*; 优势菌属为 *Streptomyces*、*Bacillus* 和 *Nocardiopsis*。其中有 80 株菌最大相似度低于 98.65% 为疑似潜在新物种, 2 株菌最大相似度低于 95.00% 为疑似潜在新属。对分离获得的 221 个菌株进行了药敏试验, 43 株菌对诺氟沙星表现出抗药性, 其中 *Streptomyces* 占主导; 25 株菌对诺氟沙星表现出中等耐药性。【结论】不同稀释浓度培养基结合添加诺氟沙星有利于塔克拉玛干沙漠极端环境微生物的分离培养, 经分离培养获得了大量的极端环境微生物菌种资源, 发现了大量微生物新物种及耐药性菌株, 为后续挖掘耐药性菌株和探索极端环境微生物资源提供了研究基础。

**关键词:** 塔克拉玛干沙漠微生物; 稀释培养基; 诺氟沙星; 药敏试验

资助项目: 兵团财政科技计划(2021BC009); 微生物代谢国家重点实验室开放课题(MMLKF22-01); 塔里木大学研究生科研创新项目(TDGRI202202); 塔里木大学校长基金(TDZKSS202236)

This work was supported by the Bingtuan Science and Technology Program (2021BC009), the Open Project of State Key Laboratory of Microbial Metabolism (MMLKF22-01), the Graduate Research and Innovation Project of Tarim University (TDGRI202202), and the President's Fund of Tarim University (TDZKSS202236).

\*Corresponding author. E-mail: fenge3721@163.com

Received: 2023-08-17; Accepted: 2023-10-19; Published online: 2023-11-27

## Diluted media supplemented with norfloxacin for mining of the microbial resources in the Taklimakan Desert

WEN Feng, LIU Shufang, WU Jiamin, WU Siyuan, Zhamila·Tuerjiang, LI Lixia, LUO Xiaoxia, XIA Zhanfeng\*

Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin, Xinjiang Production and Construction Corps, College of Life Sciences and Technology, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China

**Abstract:** [Background] The microorganisms in the Taklimakan Desert as a typical extreme habitat with high temperatures and drought demonstrate distinct regional characteristics after undergoing long-term adaptation to the environment. [Objective] To obtain culturable microbial resources in the extreme environment of the Taklimakan Desert and to explore the effects of different diluted media supplemented with norfloxacin on the isolation of microorganisms in this area. [Methods] Different dilutions of Gauze's medium No. 1, LB medium, and R2A medium were supplemented with norfloxacin at a final concentration of 0.015 µg/mL for the isolation of microorganisms from the Taklimakan Desert. [Results] A total of 246 strains were isolated and identified, which belonged to 221 species, 58 genera, 29 families, 21 orders, 6 classes of 4 phyla. *Firmicutes* and *Actinobacteria* were the dominant phyla, *Bacilli* and *Actinomycetia* the dominant classes, *Bacillales* and *Streptomycetales* the dominant orders, *Bacillaceae* and *Streptomycetaceae* the dominant families, and *Streptomyces*, *Bacillus*, and *Nocardiopsis* the dominant genera. Eighty strains with the maximum similarity lower than 98.65% were classified as potential new species, and 2 strains with the maximum similarity lower than 95.00% were classified as potential new genera. A total of 221 isolated strains were tested for drug sensitivity, among which 43 strains represented by *Streptomyces* showed resistance to norfloxacin. Twenty-five isolates showed moderate resistance to norfloxacin. [Conclusion] Different dilutions of media supplemented with norfloxacin are beneficial for the isolation of microorganisms in the extreme environment of the Taklimakan Desert. With this method, rich microbial resources were isolated, including a number of new species and drug-resistant strains. The findings provide a basis for the subsequent mining of drug-resistant strains and exploring microbial resources in extreme environments.

**Keywords:** microorganisms in the Taklimakan Desert; diluted medium; norfloxacin; drug susceptibility testing

极端环境成为当前微生物生态学研究的一个重要领域, 深受国内外微生物学家的重视<sup>[1]</sup>。塔克拉玛干沙漠位于新疆南部塔里木盆地中心, 是中国第一大沙漠、世界第十大沙漠, 也是世界第二大流动沙漠。荒漠生态系统由于特殊的环境致使研究方法受限, 使得其微生物研

究起步较迟。直到 1948 年, Fletcher 等<sup>[2]</sup>首次对美国地区沙漠土壤结皮开展研究。沙漠生态系统作为极端环境之一, 气候干热、水分蒸发强、营养水平低、盐碱化程度高、植被覆盖率较低、生物量和生物多样性极低, 因此沙漠不适宜生命体存活<sup>[3]</sup>, 但在如此恶劣的生存条件

下,却拥有大量的具有特殊抗逆性基因的微生物资源<sup>[4]</sup>。微生物作为沙漠生态系统的重要组成部分,参与了重要的生态过程,能够促进物质分解、养分转化、能量流动和生物化学循环,对于稳定荒漠生态系统、完善生态功能有重要意义<sup>[5-6]</sup>。

培养方法是以获得可培养微生物为目的研究微生物多样性、开发新的菌种资源的方法。通过试验发现依靠传统纯培养方法分离得到的微生物仅占自然环境中所有微生物的 1.0%,可培养的原核生物有 0.1%<sup>[7]</sup>,早期单纯的分离培养方法并未客观地反映土壤微生物的群落构成,为了更真实地反映土壤中的微生物群落结构、获得更多的菌种资源,越来越多的培养手段应用于微生物多样性研究中,如稀释培养、富集培养、混合培养和原位培养等手段。

控制培养基的营养水平是提高微生物分离培养水平的有效手段,适当稀释的培养基有利于寡营养环境微生物的分离培养。目前,通过使用低营养浓度的培养策略,针对未培养微生物的培养已经取得一些成效<sup>[8]</sup>,何媛秋等探究不同营养浓度培养基对南海沉积物细菌分离培养的影响,发现营养浓度较低的培养基更容易获得稀有和新的微生物类群<sup>[9]</sup>。

抗生素是一种选择性地抑制其他微生物的生长繁殖甚至杀死其他微生物的物质<sup>[6]</sup>,添加抗生素可以抑制生长速度快的、易形成菌苔的微生物,使生长速度慢的稀有微生物得以获得生长空间,形成单菌落,便于进行后期分离纯化工作。Takahashi 等采用新生霉素作为抑制剂取得了良好的分离效果,分离出了 2 个新属、5 个新种和 1 个新亚种<sup>[10]</sup>。喹诺酮类药物的作用机制是抑制病原菌的 DNA 合成及复制<sup>[11]</sup>,诺氟沙星作为第 3 代喹诺酮类药物,进一步扩大了抗菌谱和抗菌活性,包括抗细胞内繁殖的病原体<sup>[12]</sup>。前期开展了添加抗生素对新疆特殊生境微生物

分离培养的影响研究<sup>[13]</sup>,结果表明,添加抗生素对微生物的分离培养具有良好的效果,其中采用 0.015  $\mu\text{g/mL}$  诺氟沙星的分离效果最好。

本研究以塔克拉玛干沙漠样品为研究对象,采用不同稀释浓度的 LB、R2A 和高氏一号分离培养基为基础,添加 0.015  $\mu\text{g/mL}$  的诺氟沙星,对塔克拉玛干沙漠微生物进行分离培养,挖掘塔克拉玛干沙漠微生物资源,确定塔克拉玛干沙漠可培养微生物种属分类,并探讨稀释营养培养基和添加诺氟沙星对塔克拉玛干沙漠微生物分离培养的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

2022 年 7 月从塔克拉玛干沙漠中部于田县、洛浦县、阿拉尔市、且末县和沙雅县 5 个采样点采集样品。采用标准五点采样法采集样品<sup>[14]</sup>。将样品混合均匀后放入无菌封口袋中,带回实验室放置于室温保存。样品采集详细信息见表 1。大肠埃希菌(*Escherichia coli*) ATCC 25922,塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室菌种库。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶,北京全式金生物技术有限公司;引物 27F 和 1492R,生工生物工程(上海)股份有限公司;蛋白胨、酵母浸粉和酸水解酪蛋白,北京陆桥技术股份有限公司;硫酸锌、葡萄糖和可溶性淀粉,国药集团化学试剂有限公司;磷酸氢二钾和七水硫酸镁,天津市致远化学试剂有限公司;丙酮酸钠和硝酸钾,天津永晟精细化工有限公司;硫酸亚铁,天津市北联精细化学品开发有限公司;氯化锰,上海麦克林生化科技有限公司;诺氟沙星药敏片和环丙沙星药敏片,常德比克曼生物科技有限公司。

表 1 样品采集信息

Table 1 Sample collection information

Serial number	Collection area	Latitude (N)	Longitude (E)	Altitude (m)
TRM22	225th regiment of Yutian county	36°54'09"	81°17'40"	1 364.0
TRM43	G580, Luopu county, Hotan prefecture	39°04'59"	80°57'25"	1 128.5
TRM52	Fourteen Devil's Forest in Alar city	40°48'00"	82°05'59"	926.0
TRM63	Provincial highway 233 in Bazhou and Qiemo county	39°18'50"	83°48'00"	990.0
TRM100	Shaya county, Aksu city	39°37'52"	82°19'41"	988.0

高速冷冻离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 电泳仪、凝胶成像分析仪和 PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; 超微量分光光度计, 北京凯奥科技发展有限公司; 分析天平, 奥豪斯仪器(上海)有限公司; Czone9 抑菌圈测量/菌落计数仪, 杭州讯数科技有限公司。

### 1.1.3 培养基

配制终浓度为 1、1/2、1/5、1/10、1/15 和 1/20 的 LB<sup>[15]</sup>、R2A<sup>[16]</sup>和高氏一号(GS)<sup>[17]</sup>分离培养基, 1 L 培养基加入 1 mL 微量盐离子溶液(硫酸亚铁、硫酸锌和氯化锰各 1 g/1 000 mL), 并于分离培养基中分别加入浓度为 0.015  $\mu\text{g/mL}$  的诺氟沙星, 纯化培养基为对应分离培养基。

药敏试验培养基: MH 琼脂(Müller-Hinton agar)成品培养基, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 抗生素母液的制备

称取诺氟沙星 0.001 5 g 加入 10 mL 无菌水充分溶解, 制备为 1 000 倍的 0.15  $\mu\text{g/mL}$  母液。

### 1.2.2 塔克拉玛干沙漠微生物的分离培养

配制终浓度为 1、1/2、1/5、1/10、1/15 和 1/20 的 LB、R2A 和高氏一号分离培养基, 100 kPa 蒸汽灭菌 30 min, 取 1 mL 的诺氟沙星 0.15  $\mu\text{g/mL}$  母液, 加入 9 mL 无菌水稀释, 待培养基温度为 55  $^{\circ}\text{C}$  时, 分别沿瓶壁缓慢加入诺氟沙星稀释液, 使得培养基中诺氟沙星终浓度为 0.015  $\mu\text{g/mL}$ , 缓慢摇匀后倒至无菌培养皿中, 每个浓度设置

3 个重复。使用无菌丝绒布轻轻蘸取被无菌研钵充分研磨后的土样, 将约 0.1 g 土样均匀撒落至分离培养基平板表面, 将培养基平板倒置于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养分离 12–16 d, 及时观察并记录下形成菌落的种类和数量, 进行单菌落纯化培养。

### 1.2.3 微生物种类的鉴定

观察纯化后的单菌落形态和颜色, 筛除重复的菌株, 参考杨秀清等<sup>[18]</sup>方法提取 DNA 为模板, 采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGACTTA ACCCCAATCGC-3')对纯化菌株的 16S rRNA 基因进行扩增<sup>[16]</sup>。制备 1% 琼脂糖凝胶, 120 V 电泳 30 min。通过凝胶成像仪观察电泳结果, 选择条带清晰明亮、大小合适的 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果用 SeqMan Pro v7.1.0 软件对碱基序列进行拼接, 于 EzBioCloud 数据库进行比对, 进而判断出微生物的种属关系。

### 1.2.4 菌种保藏

采用甘油管冷冻保存法和真空冷冻干燥保藏法<sup>[19]</sup>对分离获得的菌株进行保藏。

### 1.2.5 耐药菌株的筛选

采用世界动物卫生组织推荐的琼脂扩散法(K-B 法)进行耐药菌株的筛选, 选取 2 种药敏片, 同为喹诺酮类的抗生素诺氟沙星和环丙沙星(对照), 将分离株新鲜菌液采用无菌涂布棒均匀涂布于 MH 平板, 将药敏片贴于培养基表面,

37 °C培养 24 h, 以大肠埃希菌 ATCC 25922 作对照, 观察并测量抑菌圈的大小并记录。重复 3 次, 抑菌圈直径为 3 次重复试验结果的平均值。结果判定按照美国临床实验室标准化委员会 2019 年的标准<sup>[20]</sup>, 根据判定结果分为敏感株、中等耐药株、抗药株。

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基稀释浓度对微生物分离培养的影响

采用终浓度为 1、1/2、1/5、1/10、1/15 和 1/20 的 LB、R2A 和高氏一号分离培养基, 整体而言, 培养基稀释浓度为 1/2 时菌落生长状况最好, 形态清晰, 种类最为丰富; 其次是稀释浓度为 1、1/5、1/10 和 1/15 的 LB 培养基; 在 1/20 稀释浓度的培养基上的生长情况长势较弱, 菌落多样性较少。洛浦县、于田县土样在各稀释浓度梯度 LB 培养基上的出菌情况见图 1。

### 2.2 添加诺氟沙星对微生物分离培养的影响

选取于田县、洛浦县、阿拉尔市、且末县和沙雅县 5 处沙漠样品, 探索诺氟沙星对微生物分离培养的影响。添加诺氟沙星于分离培养基中, 对比不同稀释浓度培养基形成菌落的形态和数量, 判断添加诺氟沙星对微生物分离培

养的影响。未添加诺氟沙星的培养基表面易形成连片菌苔, 不易形成单菌落, 且会抑制生长速度慢的微生物的生长繁殖, 5 份土样未添加诺氟沙星与添加诺氟沙星的形成菌落情况见图 2。添加 0.015 µg/mL 浓度的诺氟沙星培养基形成菌落的平均数量见图 3。

### 2.3 塔克拉玛干沙漠微生物的种类

塔克拉玛干沙漠不同样点采集的样品经过分离培养获得大量微生物菌株, 经 16S rRNA 基因测序和序列比对分析, 菌种信息见表 2。塔克拉玛干沙漠土壤共分离获得 246 株菌, 经种类鉴定分属于 4 个门 6 个纲 21 个目 29 个科 58 个属 221 个种, 优势菌门为厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*); 优势菌纲为 *Bacilli*、*Actinomycetia*; 优势菌目为 *Bacillales*、*Streptomycetales*; 优势菌科为 *Bacillaceae*、*Streptomycetaceae*; 优势菌属为 *Streptomyces*、*Bacillus* 和 *Nocardiopsis*。其中 80 株菌最大相似度低于 98.65% 为疑似潜在新物种, 其中有 2 株菌最大相似度低于 95.00% 为疑似潜在新属。

在分离鉴定的 246 株细菌中, 选取非重复的 221 株细菌的 16S rRNA 基因序列保存在 GenBank 数据库中, 登录号为 OR434619–OR434839。

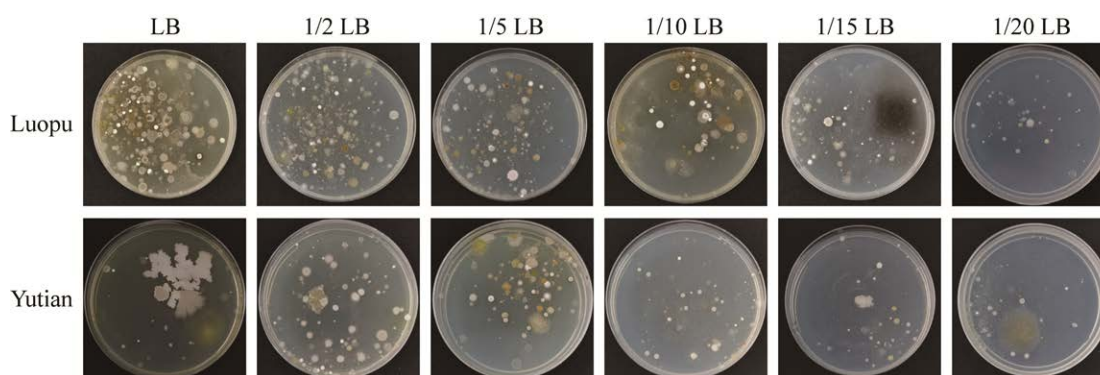


图 1 洛浦县、于田县土样在各稀释浓度梯度 LB 培养基上的菌落情况

Figure 1 Bacteria emergence of soil samples from Luopu County and Yutian County on LB medium with different dilution concentration gradients.

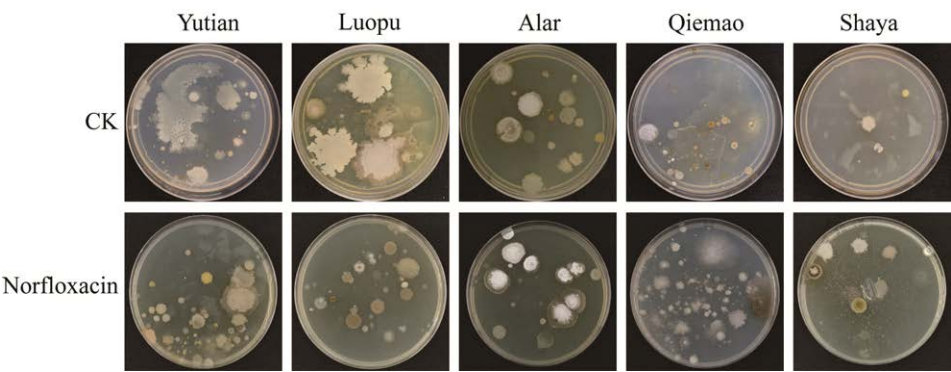


图 2 五份土样空白对照与添加诺氟沙星的形成菌落情况  
Figure 2 Colony formation in five soil samples compared with the addition of norfloxacin.

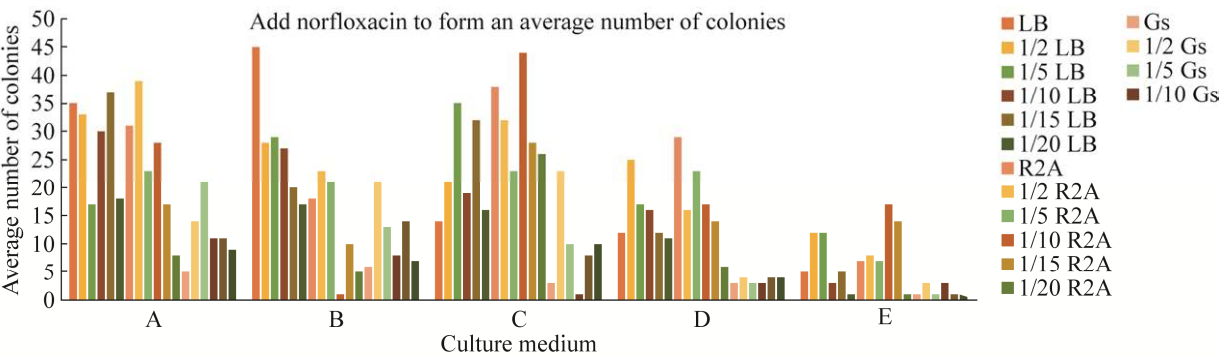


图 3 添加 0.015  $\mu\text{g/mL}$  诺氟沙星对土样菌落平均数量的影响 A: 于田县土样. B: 洛浦县土样. C: 阿拉尔市土样. D: 且末县土样. E: 沙雅县土样  
Figure 3 Effect of 0.015  $\mu\text{g/mL}$  norfloxacin supplementation on the average number of soil-like colonies. A: Yutian county soil sample. B: Luopu county soil sample. C: Alar city soil sample. D: Qiemo county soil sample. E: Shaya county soil sample.

表 2 分离培养获得的塔克拉玛干沙漠微生物  
Table 2 Classification of microorganisms in Taklimakan Desert obtained by isolation and culture

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	Limimarinicola	1
				Paracoccus	7
				Plastorhodobacter	1
				Falsirhodobacter	1
		Caulobacterales	Caulobacteraceae	Brevundimonas	1
				Phenylobacterium	1
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae	Roseomonas	2
			Thalassobaculaceae	Thalassobaculum	1
		Rhizobiales	Devosiaceae	Pelagibacterium	2
				Devosia	6
			Rhizobiaceae	Rhizobium	1
			Salinarimonadaceae	Salinarimonas	1
			Phyllobacteriaceae	Chelativorans	1

(待续)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>



## 2.4 不同菌属纯培养菌株的形态

经鉴定塔克拉玛干沙漠土样共分离获得 58 个菌属，部分代表菌属纯培养菌落形态见图 4。

## 2.5 塔克拉玛干沙漠不同区域样品微生物的群落结构差异

塔克拉玛干沙漠共分离鉴定获得 58 个菌属，菌属分布见图 5。添加诺氟沙星于不同稀释浓度的 3 种分离培养基进行分离培养，塔克拉玛干沙漠不同经纬度采样地点获得的可培养微生物的群落结构差异见图 6A。

于田县土样分离得到菌株分布在 21 个菌属，优势菌属是 *Bacillus*，占比为 20.0%，7 个独特菌属为 *Altericroceibacterium*、*Blastococcus*、*Cystobacter*、*Modestobacter*、*Nocardioides*、*Rhizobium* 和 *Verrucosisporea*，其中获得 39 株疑似新菌种。

洛浦县土样分离得到菌株分布在 20 个菌属，优势菌属为 *Nocardiopsis* 和 *Streptomyces*，占比为 21.3%，有 8 个独特菌属为 *Alkalihalobacillus*、*Brevundimonas*、*Coralloluteibacterium*、*Luteimonas*、*Microvirga*、*Pseudomonas*、*Rossellomorea* 和 *Ureibacillus*，其中获得 23 株疑似新菌种。

阿拉尔市土样分离得到菌株分布在 16 个菌属，优势菌属为 *Bacillus*、*Cytobacillus*、*Streptomyces*，占比为 12.9%，有 3 个独特菌属为 *Microbacterium*、*Salinarimonas* 和 *Salirhabdus*，其中获得 5 株疑似新菌种和 1 株相似度为 94.22% 的疑似新菌属。

且末县土样分离得到菌株分布在 23 个菌属，优势菌属是 *Streptomyces*，占比为 34.6%，其中有 6 个独特菌属为 *Falsirhodobacter*、*Leifsonia*、*Litchfieldia*、*Lysobacter*、*Myceligeners*、

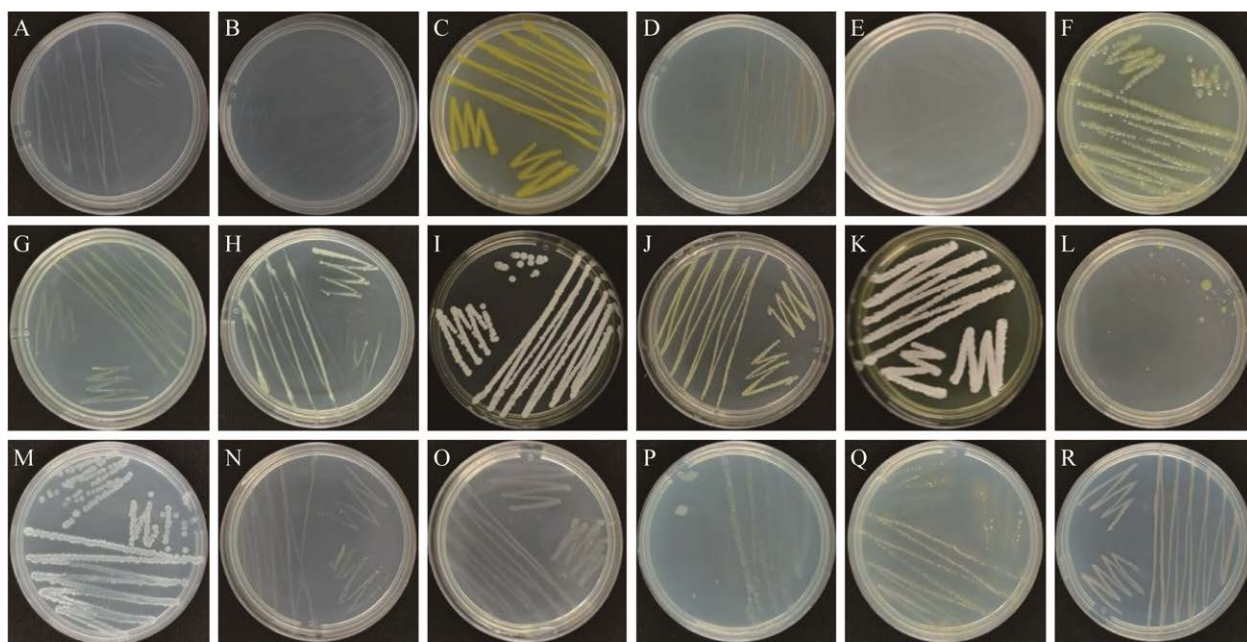


图 4 部分菌属代表属种的纯化菌株形态

Figure 4 Morphology of purified strains from partial bacterium genera and species. A: *Limimarinicola*. B: *Altericroceibacterium*. C: *Luteimonas*. D: *Micromonospora*. E: *Cystobacter*. F: *Brevundimonas*. G: *Georgenia*. H: *Thalassobaculum*. I: *Nocardiopsis*. J: *Myceligeners*. K: *Shigella*. L: *Lysobacter*. M: *Saccharothrix*. N: *Croceicoccus*. O: *Sutcliffiella*. P: *Terribacillus*. Q: *Cytobacillus*. R: *Modestobacter*.



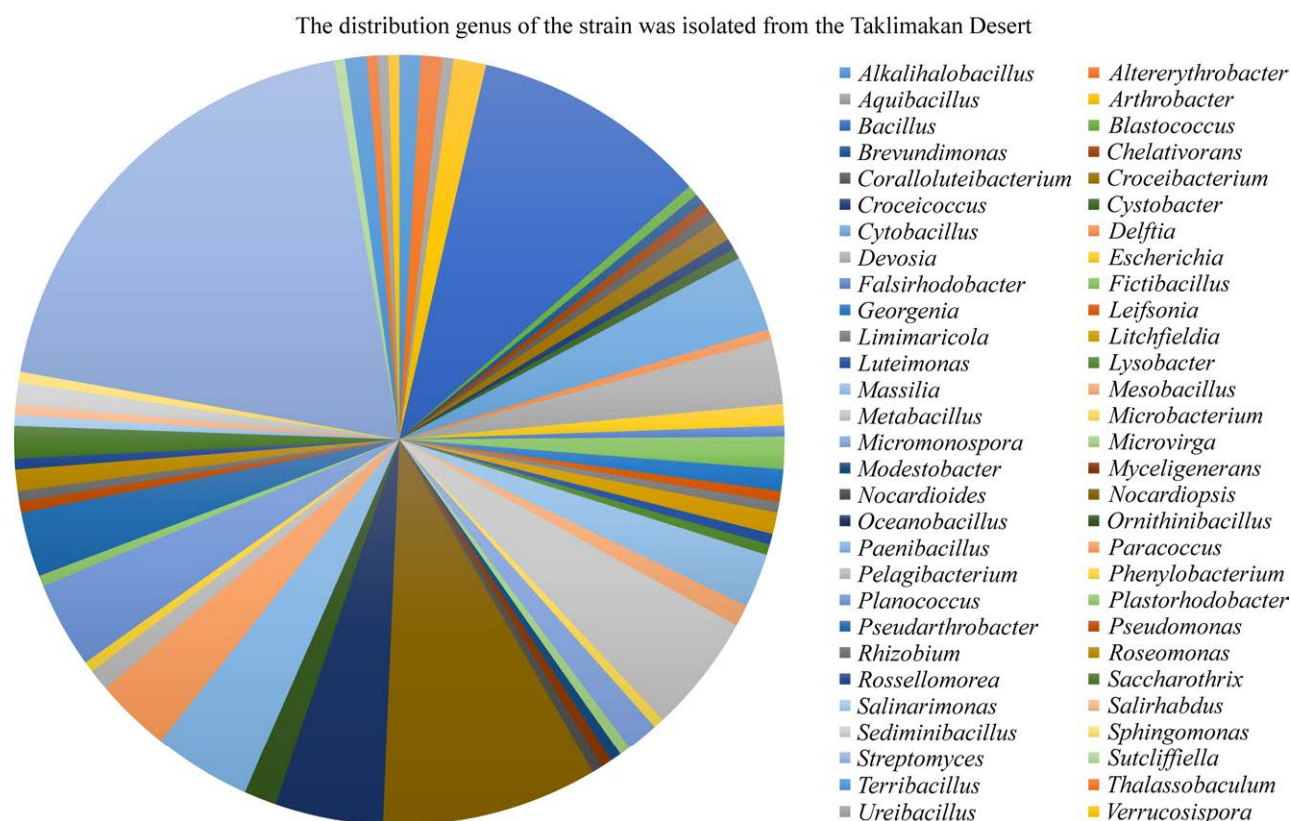


图 5 塔克拉玛干沙漠分离到的菌属分布

Figure 5 The distribution genus of the strain was isolated from the Taklimakan Desert.

*Sphingomonas*, 其中获得 16 株疑似新种和 1 株相似度为 94.89% 的疑似新属。

沙雅县土样分离得到总计 21 个属的微生物菌株, 其中优势菌属 *Streptomyces*, 占比为 16.6%, 有 13 个独特菌属为 *Altericroceibacterium*、*Aquibacillus*、*Chelativorans*、*Croceicoccus*、*Delftia*、*Georgenia*、*Limimaricola*、*Pelagibacterium*、*Phenylobacterium*、*Plastorhodobacter*、*Sediminibacillus*、*Sutcliffiella* 和 *Thalassobaculum*, 其中获得了 16 株疑似新菌种。

在 5 份土样中均分离获得 3 个属, 分别为 *Streptomyces*、*Bacillus* 和 *Metabacillus*, *Streptomyces* 属于放线菌门, *Bacillus* 和 *Metabacillus* 属于厚壁菌门, 占总属的 5.2%。在属的层面上, 揭示出了 5 份土样的主要差异, 不同采样点体现出

对某些特殊类群细菌的选择性, 每份土样均能分离获得其他土样培养不出的特殊菌(图 6B)。

## 2.6 不同稀释浓度培养基获得的菌属分布

在不同稀释浓度梯度培养基条件下对塔克拉玛干沙漠微生物分离培养, 获得的微生物在属水平上的多样性如图 7 所示。

LB 各浓度梯度共获得 167 个种分属于 50 个属, 其中 *Streptomyces*、*Nocardiopsis* 在 LB 培养基多个稀释浓度梯度均有获得; *Alkalihalobacillus*、*Aquibacillus*、*Chelativorans*、*Coralloluteibacterium*、*Luteimonas*、*Rosellomorea* 和 *Ureibacillus* 这 7 个菌属只在 LB 培养基中发现; *Brevundimonas*、*Lysobacter*、*Microvirga*、*Myceligeners*、*Plastorhodobacter* 和 *Thalassobaculum* 这 6 个菌属只在 1/2 LB 培养基中发现; *Cystobacter*、

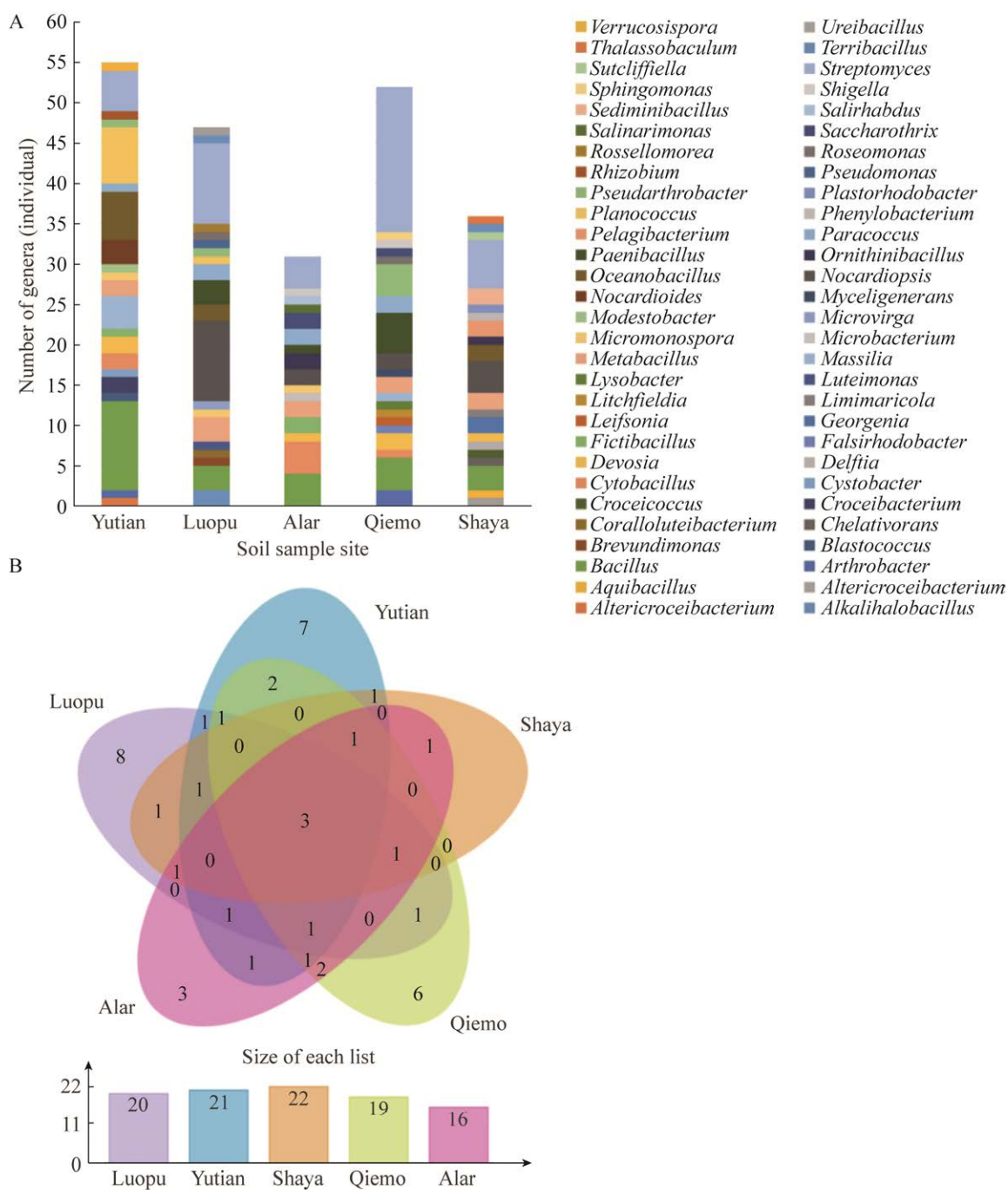


图 6 不同土样分离可培养微生物属水平群落结构(A)及属水平数目韦恩图(B)

Figure 6 Community structure of culturable microorganisms at genus level (A) and Venn diagram of number at genus level (B) obtained from different soil samples.

*Roseomonas* 和 *Terribacillus* 这 3 个菌属只在 1/5 LB 培养基中发现; *Altericroceibacterium*、*Modestobacter*、*Nocardioides*、*Pseudomonas*、

*Rhizobium*、*Salinarimonas*、*Salirhabdus* 和 *Verrucosipora* 这 8 个菌属只在 1/10 LB 培养基中发现; *Croceicoccus*、*Microbacterium*、

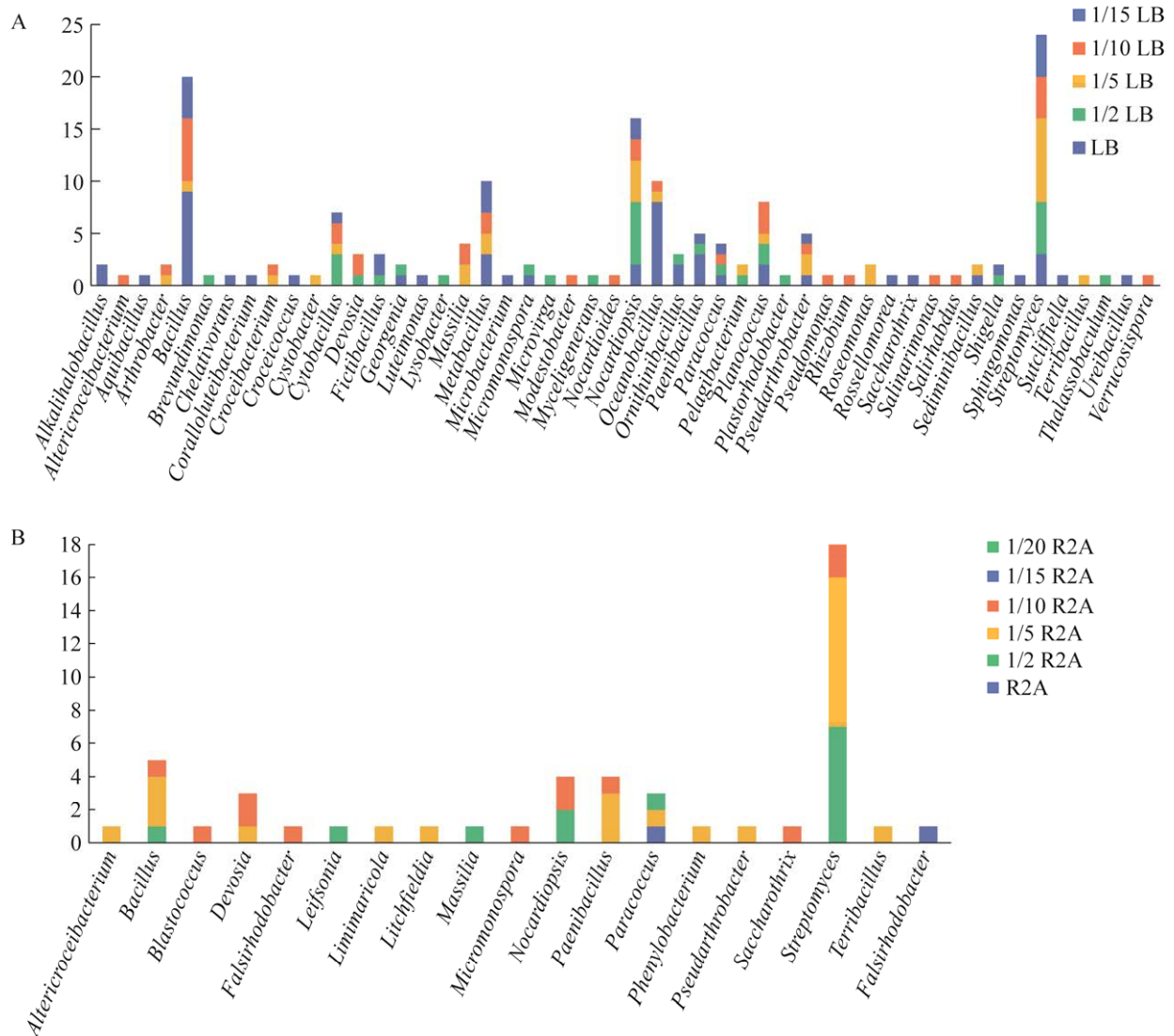


图 7 不同稀释浓度的 LB (A)和 R2A (B)培养基获得的菌属分布

Figure 7 Distribution of bacterial genera obtained from LB (A) and R2A (B) medium with different dilution concentrations.

*Saccharothrix*、*Sphingomonas* 和 *Sutcliffeella* 这 5 个菌属只在 1/15 LB 培养基中发现。

R2A 各浓度梯度共获得 49 个种分属于 20 个属,其中 *Bacillus*、*Streptomyces* 在 1/2 R2A、1/5 R2A 和 1/10 R2A 中均有发现, R2A 和 1/20 R2A 仅获得 1 个属均为 *Paracoccus*; 有 2 个菌属 *Leifsonia* 和 *Massilia* 只在 1/2 R2A 培养基中发现; *Altericroceibacterium*、*Limimarinicola*、*Litchfieldia*、

*Phenyllobacterium*、*Pseudarthrobacter* 和 *Terribacillus* 这 6 个菌属只在 1/5 R2A 培养基中发现; *Blastococcus*、*Falsirhodobacter*、*Micromonospora* 和 *Saccharothrix* 这 4 个菌属只在 1/10 R2A 培养基中发现; *Falsirhodobacter* 只在 1/15 R2A 培养基中发现。

## 2.7 药敏试验结果

采用琼脂扩散法对塔克拉玛干沙漠土样分

离鉴定获得的 221 株菌进行药敏试验, 共有 43 株菌为诺氟沙星抗药株, 其中 *Streptomyces* 占主导共 15 株; 获得 15 株诺氟沙星中等耐药株, 其中 *Streptomyces* 占 4 株; 其余 163 株为对诺氟沙星敏感株。耐药性菌株占总分离菌株数的 26.24% (表 3)。

### 3 讨论与结论

采用 LB、R2A 和高氏一号 3 种培养基分离培养, 观察菌落的形态、颜色、大小等特征, LB 平板中的菌落数量多且种类更丰富, 而高氏一号平板的菌落形态较单一, 挑取菌株时以 LB、R2A 平板中的单菌落为主, 高氏一号平板的单菌落作为补充。LB 培养基是一种营养物质丰富、能够满足大多数细菌生长的培养基; R2A 培养基虽然由碳源、氮源、矿物质、维生素、

普通和特殊的添加剂等多种成分组成, 其中丙酮酸钠可增强细菌的复苏, 但 R2A 培养基为寡营养培养基, 因此分离培养微生物的效果次之; 高氏一号主要是用来培养和观察放线菌形态特征的合成培养基, 分离到的多为链霉菌, 因此培养基分离效果最好的是 LB 培养基, 其次是 R2A 培养基, 最后是高氏一号培养基。

沙漠微生物在 1/2 稀释浓度的分离培养基上的分离效果最好, 形成微生物菌落的种类和数量最为丰富多样, 由于原浓度培养基营养成分相对较为丰富, 生长的多为生长速度快的常见微生物, 甚至会抑制生长缓慢的稀有微生物, 因此原浓度相较于 1/2 浓度分离培养基的分离效果较差。在 1/20 稀释浓度的分离培养基上, 5 种土样的微生物菌落生长较羸弱, 微生物种类不多, 由于稀释浓度为 1/20 的分离培养基营

表 3 耐药性菌株信息

Table 3 Information on resistant strains

No.	Serial number	Similar strain	Bacteriostatic ring diameter (mm)	Drug resistance
1	TRM82007	<i>Limimanicola variabilis</i>	4.50	R
2	TRM82008	<i>Massilia agri</i>	12.00	I
3	TRM82009	<i>Planococcus halotolerans</i>	13.10	I
4	TRM82016	<i>Oceanobacillus picturae</i>	12.30	I
5	TRM82017	<i>Cystobacter fuscus</i>	6.80	R
6	TRM82019	<i>Brevundimonas alba</i>	13.10	I
7	TRM82025	<i>Streptomyces calidiresistens</i>	6.00	R
8	TRM82026	<i>Bacillus tequilensis</i>	13.00	I
9	TRM82027	<i>Nocardiopsis arvandica</i>	2.00	R
10	TRM82030	<i>Streptomyces mangrovi</i>	0.00	R
11	TRM82031	<i>Metabacillus idriensis</i>	0.00	R
12	TRM82033	<i>Streptomyces althioticus</i>	0.00	R
13	TRM82037	<i>Pelagibacterium lixinzhangensis</i>	3.10	R
14	TRM82038	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	0.00	R
15	TRM82039	<i>Streptomyces canalis</i>	0.00	R
16	TRM82043	<i>Myceligenans salitolerans</i>	8.00	R
17	TRM82045	<i>Paenibacillus antri</i>	15.00	I
18	TRM82050	<i>Streptomyces roseolilacinus</i>	14.30	I

(待续)

(续表 3)

No.	Serial number	Similar strain	Bacteriostatic ring diameter (mm)	Drug resistance
19	TRM82059	<i>Paracoccus pueri</i>	0.00	R
20	TRM82060	<i>Streptomyces calidiresistens</i>	0.00	R
21	TRM82061	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	0.00	R
22	TRM82067	<i>Nocardiosis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	0.00	R
23	TRM82068	<i>Pelagibacterium lixinzhangensis</i>	0.00	R
24	TRM82069	<i>Terribacillus halophilus</i>	9.00	R
25	TRM82074	<i>Streptomyces rubrogriseus</i>	0.00	R
26	TRM82076	<i>Streptomyces mangrovi</i>	15.00	I
27	TRM82077	<i>Devosia chinhatensis</i>	0.00	R
28	TRM82078	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	0.00	R
29	TRM82079	<i>Litchfieldia alkalitelluris</i>	14.00	I
30	TRM82081	<i>Phenylobacterium koreense</i>	0.00	R
31	TRM82082	<i>Bacillus mesophilus</i>	9.00	R
32	TRM82088	<i>Rhizobium halotolerans</i>	8.00	R
33	TRM82089	<i>Devosia chinhatensis</i>	6.00	R
34	TRM82114	<i>Streptomyces luridus</i>	13.00	I
35	TRM82140	<i>Oceanobacillus picturae</i>	0.00	R
36	TRM82142	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	15.70	I
37	TRM82143	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	16.00	I
38	TRM82146	<i>Nocardiosis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	0.00	R
39	TRM82148	<i>Chelativorans xinjiangense</i>	14.00	I
40	TRM82149	<i>Sediminibacillus massiliensis</i>	0.00	R
41	TRM82166	<i>Streptomyces luridus</i>	0.00	R
42	TRM82168	<i>Streptomyces luridus</i>	0.00	R
43	TRM82174	<i>Pseudarthrobacter psychrotolerans</i>	0.00	R
44	TRM82176	<i>Pseudarthrobacter psychrotolerans</i>	0.00	R
45	TRM82177	<i>Streptomyces asenjonii</i>	12.30	I
46	TRM82182	<i>Paracoccus marcusii</i>	6.20	R
47	TRM82184	<i>Streptomyces niveoruber</i>	0.00	R
48	TRM82185	<i>Streptomyces calidiresistens</i>	0.00	R
49	TRM82187	<i>Streptomyces lavendulocolor</i>	0.00	R
50	TRM82188	<i>Streptomyces luridus</i>	0.00	R
51	TRM82191	<i>Bacillus mesophilus</i>	6.00	R
52	TRM82192	<i>Nocardiosis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	0.00	R
53	TRM82209	<i>Streptomyces mangrovi</i>	0.00	R
54	TRM82210	<i>Paracoccus pueri</i>	0.00	R
55	TRM82218	<i>Nocardiosis halotolerans</i>	0.00	R
56	TRM82219	<i>Streptomyces calidiresistens</i>	0.00	R
57	TRM82222	<i>Nocardiosis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i>	15.10	I
58	TRM82224	<i>Streptomyces mangrovi</i>	0.00	R

R: 耐药; I: 中介

R: Resistance; I: Intermediary.



养水平较低,且添加抗生素会抑制部分微生物的生长,因此当培养基稀释浓度低于 1/20 时不适于添加诺氟沙星进行分离培养。大部分经稀释处理后的分离培养基都获得了独特菌属。本研究结果表明,使用合适稀释的培养基更有利于分离获得更多塔克拉玛干沙漠寡营养微生物,仅使用传统培养基难以获取的某些特殊微生物。结合采用富营养的传统培养基和寡营养的稀释培养基对塔克拉玛干沙漠微生物进行研究可以更好地反映出微生物资源多样性,为进一步对塔克拉玛干沙漠微生物资源的研究和利用奠定基础。

本研究过程中有些菌株在低浓度培养基中被分离得到,在后期纯化中,纯化是逐级提高培养基浓度时可以在浓度为 1/20 的培养基生长,第二次纯化无法生长,转移至略高浓度梯度营养水平可纯化出来,说明在实验过程中部分菌株出现驯化情况。武凤霞等<sup>[21]</sup>通过将微生物接种于不同浓度培养基上分离培养,发现培养基浓度会影响微生物分离,在实验中,部分菌株出现驯化现象,与本实验结果一致。

本次研究经种类鉴定分属于 4 个门 6 个纲 21 个目 29 个科 58 个属 221 个种,属于 *Actinomycetia* 的 *Streptomyces* 为主导优势属,分属于 43 个种,占总种的 19%; *Bacilli* 的 *Bacillus* 为第二优势属,分属于 22 个种,占总种的 10%; 属于 *Actinomycetia* 的 *Nocardiopsis* 为第三优势属,分属于 20 个种,占总种的 9%。*Streptomyces* 和 *Nocardiopsis* 皆属于 *Actinomycetia* 的放线菌,放线菌在干旱环境中作为优势菌株不足为奇,因为它们具有很强的产孢能力,孢子耐受极端环境能力强,且具有次生代谢物合成和多重紫外修复机制<sup>[22-24]</sup>。芽孢杆菌属细菌广泛存在于极地、沙漠和盐湖等极端环境中,参与碳、氮循环,常被应用于生物肥料、生物

降污、种子保护和生物防治等方面<sup>[25]</sup>,与其他沙漠微生物群落分布类似,芽孢杆菌属在我国其他类似环境的沙漠地区,如毛乌素沙地曾分离出大量芽孢杆菌<sup>[26]</sup>。芽孢杆菌还能够产生芽孢,能抵御恶劣气候、耐盐耐热等<sup>[27]</sup>。塔克拉玛干沙漠的优势菌种体现了环境对菌种淘汰选择的同时,也体现了这些微生物对高温、干旱、高盐碱等极端环境的强大适应性。

通过向分离培养基添加诺氟沙星,共分离获得 80 个新种 2 个新属,其中分离于田县沙土样品获得 19 株疑似新菌种,分离阿拉尔市沙土样品获得 5 株疑似新菌株,1 株疑似新菌属,分离洛浦县沙土样品获得 23 株疑似新菌株,分离且末县沙土样品获得 16 株疑似新菌种,1 株疑似新菌属,分离沙雅县沙土样品获得 16 株疑似新菌种。添加诺氟沙星作为抑制剂,有利于抑制生长速度快的常见微生物,分离到更多生长缓慢的稀有微生物。本次研究共获得 43 株诺氟沙星抗药株,其中 *Streptomyces* 占 34.88%; 获得 15 株诺氟沙星中等耐药株,其中 *Streptomyces* 占 26.66%,表明 *Streptomyces* 的菌株大多具有耐药性。链霉菌是一种来源于土壤的革兰氏阳性菌,具有复杂的生活周期和次级代谢途径,能够产生多种药用和农用抗生素以及多种具有生物活性的次级代谢产物。在长期的进化中,链霉菌必须积累适当的抗生素耐药基因和相应的调节基因,以保护自身免受致命代谢物的破坏<sup>[28]</sup>,与本研究结果相符。虽然本次研究获得具有耐药性的菌株占总体的 29.41%,但培养基添加诺氟沙星的浓度仅为 0.015  $\mu\text{g/mL}$ ,远低于采用的诺氟沙星药敏片(10  $\mu\text{g}$ )剂量。结果表明,添加诺氟沙星有利于筛选更多的耐药性菌株,早在 20 世纪 50 年代初,人们就发现抗生素的耐药水平与抗生素的产量之间有一定的联系,并把提高耐药水平作为获得抗生素高产菌株的途径



之一<sup>[29]</sup>, 该方法可为高效挖掘活性菌株奠定基础、抗生素环境污染的降解和抗菌新药的研发策略提供了新的思路和途径。

沙漠样品中的矿物质、有机物和微生物往往吸附于沙粒表面和内部缝隙, 难以充分释放, 本次研究对沙漠样品进行精细研磨, 可以确保各种成分和微生物充分释放和分离。采用稀释传统分离培养基营养浓度, 更有利于提高寡营养环境微生物的可培养性。本研究未采用传统的稀释涂布分离法, 采用无菌丝绒布拍撒法减少了水对干旱环境微生物的影响。通过优化改良传统的微生物分离方法, 从塔克拉玛干沙漠样品中分离获得了丰富的微生物资源及大量潜在新物种。

本次研究添加诺氟沙星于多种稀释浓度的分离培养基中, 分离培养塔克拉玛干沙漠微生物, 共分离获得 246 株菌, 分属于 4 个门 6 个纲 21 个目 29 个科 58 个属 221 个种, 优势菌门为 *Firmicutes* 和 *Actinobacteria*; 优势菌纲为 *Bacilli*、*Actinomycetia*; 优势菌目为 *Bacillales*、*Streptomycetales*; 优势菌科为 *Bacillaceae*、*Streptomycetaceae*; 优势菌属为 *Streptomyces*、*Bacillus* 和 *Nocardiopsis*。其中有 80 株菌最大相似度低于 98.65% 为疑似潜在新物种, 其中有 2 株菌最大相似度低于 95.00% 为疑似潜在新属。表明塔克拉玛干沙漠具有丰富的可培养微生物资源, 对丰富微生物资源库具有重大意义。虽与其他环境相比, 塔克拉玛干沙漠营养物质匮乏、环境气候极端, 可培养细菌生物量偏小, 但可培养的细菌多为抗性、耐性强的极端微生物<sup>[30-31]</sup>。该地区特有的微生物资源、功能微生物和新种资源丰富, 为防治沙漠化、开发微生物菌剂等研究奠定了物质基础。本研究结果对塔克拉玛干沙漠的自然生态保护以及极端微生物资源的应用具有重要意义。

## REFERENCES

- [1] 庄滢潭, 刘芮存, 陈雨露, 杨岑玥, 余岩, 王涛, 王友亮, 宋亚军, 滕越. 极端微生物及其应用研究进展[J]. 中国科学(生命科学), 2022, 52(2): 204-222.  
ZHUANG YT, LIU RC, CHEN YL, YANG CY, YU Y, WANG T, WANG YL, SONG YJ, TENG Y. Research progress of extreme microorganism and its application[J]. Scientia Sinica (Vita), 2022, 52(2): 204-222 (in Chinese).
- [2] FLETCHER JE, MARTIN WP. Some effects of algae and molds in the rain-crust of desert soils[J]. Ecology, 1948, 29(1): 95-100.
- [3] D'ODORICO P, BHATTACHAN A, DAVIS KF, RAVI S, RUNYAN CW. Global desertification: drivers and feedbacks[J]. Advances in Water Resources, 2013, 51: 326-344.
- [4] 张子怡, 李卓然, 阮爱东, 武帅, 鲁祥. 新疆荒漠地带裸土剖面微生物群落结构和功能分析[J]. 生物资源, 2022, 44(3): 275-284.  
ZHANG ZY, LI ZR, RUAN AD, WU S, LU X. Analysis of microbial community structure and function of bare soil profile in desert area of Xinjiang[J]. Amino Acids and Biotic Resources, 2022, 44(3): 275-284 (in Chinese).
- [5] 李善家, 王福祥, 从文倩, 魏明, 王军强, 崔莉娟, 王子濠. 河西走廊荒漠土壤微生物群落结构及环境响应[J]. 土壤学报, 2022, 59(6): 1718-1728.  
LI SJ, WANG FX, CONG WQ, WEI M, WANG JQ, CUI LJ, WANG ZH. Microbial community structure and environmental response of desert soil in Hexi Corridor[J]. Acta Pedologica Sinica, 2022, 59(6): 1718-1728 (in Chinese).
- [6] 陈燕飞. pH 对微生物的影响[J]. 太原师范学院学报(自然科学版), 2009, 8(3): 122-124.  
CHEN YF. pH to Uygur biology influence[J]. Journal of Taiyuan Normal University (Natural Science Edition), 2009, 8(3): 122-124 (in Chinese).
- [7] ALAIN K, QUERELLOU J. Cultivating the uncultured: limits, advances and future challenges[J]. Extremophiles, 2009, 13(4): 583-594.
- [8] KIM J. Review and future development of new culture methods for unculturable soil bacteria[J]. Korean Journal of Microbiology, 2011, 47(3): 179-187.
- [9] 何媛秋, 李存, 陈柔雯, 崔林青, 田新朋. 不同培养条件对海洋沉积环境细菌的选择性分离[J]. 生物资源, 2020, 42(5): 540-548.  
HE YQ, LI C, CHEN RW, CUI LQ, TIAN XP.

- Selective isolation of bacteria from marine sedimentary environment by different culture conditions[J]. *Amino Acids and Biotic Resources*, 2020, 42(5): 540-548 (in Chinese).
- [10] TAKAHASHI Y, OMURA S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2003, 49(3): 141-154.
- [11] 尹琦, 张雯雁, 叶杨芹, 沈李花, 毛培文, 梁永杰. 利福平、利奈唑胺与糖肽类抗生素对预防耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药的比较[J]. *上海医学*, 2013, 36(1): 27-29.
- YIN Q, ZHANG WY, YE YQ, SHEN LH, MAO PW, LIANG YJ. Pharmacodynamic investigation of rifampicin, linezolid and glycopeptide antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Shanghai Medical Journal*, 2013, 36(1): 27-29 (in Chinese).
- [12] 黎微微. 喹诺酮类抗生素耐药情况及其耐药机制研究[J]. *中国疗养医学*, 2013, 22(12): 1090-1093.
- LI WW. Study on drug resistance of quinolones and its mechanism[J]. *Chinese Journal of Convalescent Medicine*, 2013, 22(12): 1090-1093 (in Chinese).
- [13] 文凤, 宋迎, 张珍, 李丽霞, 罗晓霞, 万传星, 夏占峰. 添加抗生素对新疆特殊生境微生物分离培养的影响[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(8): 3314-3329.
- WEN F, SONG Y, ZHANG Z, LI LX, LUO XX, WAN CX, XIA ZF. Effects of antibiotics on isolation and culture of microorganisms from special habitats in Xinjiang of China[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(8): 3314-3329 (in Chinese).
- [14] 全国农业技术推广服务中心, 湖南省土壤肥料工作站, 江西省土壤肥料技术推广站. 土壤检测. 第1部分: 土壤样品的采集、处理和贮存[S]. 北京: 行业标准-农业, 2006.
- National Agricultural Technology Extension Service Center, Hunan Province Soil Fertilizer Workstation, Jiangxi Province soil fertilizer technology extension station. Soil testing. Part 1: collection, treatment and storage of soil samples[S]. Beijing: Industry Standard – Agriculture, 2006 (in Chinese).
- [15] 刘阳. 塔克拉玛干沙漠可培养微生物多样性及抗辐射-抗氧化代谢机制研究[D]. 兰州: 西北师范大学硕士学位论文, 2020.
- LIU Y. Diversity of culturable microorganisms in Taklimakan Desert and mechanism of anti-radiation and anti-oxidation metabolism[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Northwest Normal University, 2020 (in Chinese).
- [16] 许璐, 曹晓璐, 王士燕, 孙磊, 李潞滨. 库姆塔格沙漠北界阿奇克谷地土壤可培养细菌多样性[J]. *核农学报*, 2017, 31(2): 342-349.
- XU L, CAO XL, WANG SY, SUN L, LI LB. The diversity of cultivable bacteria of soil in Aqik Valley, the north boundary of Kumtag Desert[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2017, 31(2): 342-349 (in Chinese).
- [17] 龙建友. 新型农用抗生素的筛选研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2003.
- LONG JY. Studies on screening of new agricultural antibiotics[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2003 (in Chinese).
- [18] 杨秀清, 陈彦梅, 吴瑞薇, 王保玉, 韩作颖. 煤地质环境微生物总基因组 DNA 提取方法的优化[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(9): 177-183.
- YANG XQ, CHEN YM, WU RW, WANG BY, HAN ZY. Optimization of total genome DNA extraction method for microorganisms in coal geological environment[J]. *Bulletin of Biotechnology*, 2018, 34(9): 177-183 (in Chinese).
- [19] 孙葭. 浅谈微生物菌种保藏方法[J]. *轻工标准与质量*, 2021(1): 95-96.
- SUN W. Preservation Methods of Microbial Strains[J]. *Standard & Quality of Light Industry*, 2021(1): 95-96 (in Chinese).
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 29th informational supplement. CLSI document M100-S29[S]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.
- [21] 武凤霞, 张淑彬, 应梦真, 刘建斌. 不同培养基浓度对土壤耐低温微生物分离效果的影响[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 50(2): 315-318.
- WU FX, ZHANG SB, YING MZ, LIU JB. Effects of nutrient medium concentrations on isolation of cold adapted microorganisms[J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2019, 50(2): 315-318 (in Chinese).
- [22] ENSIGN JC. Formation, properties, and germination of actinomycete spores[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1978, 32: 185-219.
- [23] MCCARTHY AJ, WILLIAMS ST. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment—a review[J]. *Gene*, 1992, 115(1/2): 189-192.
- [24] GAO QJ, GARCIA-PICHEL F. Microbial ultraviolet sunscreens[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011,

- 9(11): 791-802.
- [25] 康平. 芽孢杆菌在微生物肥料中的研究与应用进展[J]. 山东林业科技, 2014, 44(3): 129-132.
- KANG P. Development of research and application of *Bacillus* sp. in microbial fertilizers[J]. Journal of Shandong Forestry Science and Technology, 2014, 44(3): 129-132 (in Chinese).
- [26] 刘慧娟. 毛乌素沙地土壤生物结皮细菌多样性分析与拮抗菌株 5A5-3 的筛选鉴定[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2011.
- LIU HJ. Culturable Bacterial Diversity of Biological Soil Crusts in Mu Us Desert and Screening and Identification of Antagonistic Bacterial Strain 5A5-3[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [27] ROONEY AP, PRICE NPJ, EHRHARDT C, SWEZEY JL, BANNAN JD. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(Pt 10): 2429-2436.
- [28] DAVIES JE. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants[J]. Ciba Foundation Symposium, 1997, 207: 15-27.
- [29] 黄健强, 陆雍涛, 姜卫红, 张菁, 赵国屏, 杨蕴刘. 丝裂霉素 C 抗性基因(*mcr*)的克隆及其高效表达[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(1): 9-15.
- HUANG JQ, LU YT, JIANG WH, ZHANG J, ZHAO GP, YANG YL. Cloning and high expression of mitomycin C resistance gene (*mcr*)[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Biophysics, 2000, 32(1): 9-15 (in Chinese).
- [30] LUO XS, ZENG XC, HE ZC, LU XL, YUAN J, SHI JJ, LIU M, PAN YF, WANG YX. Isolation and characterization of a radiation-resistant bacterium from Taklamakan Desert showing potent ability to accumulate lead (II) and considerable potential for bioremediation of radioactive wastes[J]. Ecotoxicology, 2014, 23(10): 1915-1921.
- [31] RAINEY FA, RAY K, FERREIRA M, GATZ BZ, NOBRE MF, BAGALEY D, RASH BA, PARK MJ, EARL AM, SHANK NC, SMALL AM, HENK MC, BATTISTA JR, KÄMPFER P, da COSTA MS. Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5225-5235.