

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
51(1):122–126; 4 January 2011  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 塔克拉玛干沙漠腹地胡杨林土壤细菌多样性分析

包慧芳, 王伟\*, 王宁, 房世杰, 詹发强

新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091

**摘要:**【目的】对塔克拉玛干沙漠腹地胡杨林土壤细菌多样性进行初步探索, 为下一步从中筛选可用于生物饲料或生物肥料的微生物奠定基础。【方法】采用可培养方法, 进行细菌的分离纯化。对各菌株进行革兰氏染色及淀粉酶、酯酶、纤维素酶和 NaCl 耐受浓度的测定, 并提取各菌株基因组 DNA, 进行 16S rRNA 基因扩增、测序及系统进化树的绘制, 分析其多样性。【结果】共分离得到 27 株菌, 其中放线菌门 (*Actinobacteria*) 16 株, 变形菌门 (*Proteobacteria*) 4 株, 厚壁菌门 (*Firmicutes*) 6 株, 拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 1 株。革兰氏染色结果表明, 5 株菌为革兰氏阴性, 其余为革兰氏阳性; 酶活测定结果表明, 15 株菌具有淀粉酶活性, 9 株菌具有酯酶活性, 9 株菌具有纤维素酶活性; NaCl 耐受浓度测定结果显示, NaCl 浓度为 2% 时所有菌株均能生长, 5% 时能生长的有 22 株, 15% 时能生长的有 1 株。【结论】塔克拉玛干沙漠腹地胡杨林土壤中存在较丰富的细菌类群, 且具有一定的酶学活性和 NaCl 耐受性, 具有进一步研究开发的價值。

**关键词:** 塔克拉玛干沙漠, 胡杨林, 细菌, 多样性

**中图分类号:** Q933      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011)01-0122-05

塔克拉玛干沙漠是中国境内最大的沙漠, 也是全世界最大的流动沙漠。沙漠中心是典型的大陆性气候, 极端最高气温 45.6°C, 极端最低气温 -22.2°C, 年降水量 36.6 mm, 平均相对湿度 29.4%, 潜在蒸发量为 3638.6 mm, 属极端干旱荒漠。纵贯沙漠的和田河两岸, 生长着芦苇、胡杨等多种沙生植被, 构成沙漠中的“绿色走廊”<sup>[1]</sup>。

塔克拉玛干沙漠盐分含量为 1.26–1.63 g/kg<sup>[2]</sup>, 是筛选极端微生物及生理活性物质产生菌的重要地区<sup>[3]</sup>。而目前有关塔克拉玛干沙漠微生物多样性的报道极少, 仅在塔克拉玛干沙漠腹地进行过有关土壤微生物数量、组成的初步研究<sup>[4–6]</sup>。本研究对塔克拉玛干沙漠腹地胡杨林土

壤中细菌多样性进行初步探索, 为下一步筛选可用于生物饲料或生物肥料的微生物奠定基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** PCR 反应试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, PCR 扩增引物合成及样品测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。离心机为 Eppendorf Centrifuge 5417R, PCR 仪为 Eppendorf Mastercycler® ep, 凝胶成像系统 GK-330C 购自美国联合生物科技有限公司。

**1.1.2 样品来源:** 土壤样品采自塔克拉玛干沙漠腹地胡杨林中(38°37'N, 80°52'E), 于林地随机选取 5

**基金项目:** 国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA21201-12); 新疆自治区科技基础平台建设项目(PT0807); 新疆自治区重大专项(200740147-2)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-991-4534829; E-mail: whangwei0718@126.com

**作者简介:** 包慧芳(1978–), 女, 湖南人, 助理研究员, 硕士, 主要从事分子生物学及微生物资源研究。E-mail: bhfcfs@126.com

**收稿日期:** 2010-07-10; **修回日期:** 2010-09-17

处深度为 0 cm - 10 cm 的土壤样品,混匀后装入无菌容器内,车载冰箱运至实验室,4℃ 保存备用。

1.1.3 分离培养基:牛肉膏蛋白胨培养基和高氏一号培养基<sup>[7]</sup>。

1.2 菌株的分离与纯化

依据梯度稀释法,进行菌株的分离纯化<sup>[8]</sup>。其中牛肉膏蛋白胨培养基平板置 37℃ 培养,高氏一号培养基平板置 28℃ 培养。

1.3 菌株部分生理生化特征

1.3.1 革兰氏染色:分别对各菌株进行革兰氏染色,电子显微镜观察染色结果<sup>[9]</sup>。

1.3.2 酶活性检测:在分离培养基中分别加入相应底物,进行淀粉酶、酯酶、纤维素酶的测定<sup>[8,10]</sup>。

1.3.3 NaCl 耐受实验:在分离培养基中分别添加 2%、5%、15% 的 NaCl,将各菌株分别接种至相应平板,观察生长情况。

1.4 16S rRNA 基因 PCR 扩增和系统进化分析

1.4.1 DNA 扩增:提取各菌株基因组 DNA<sup>[11]</sup>。用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F、1429R<sup>[12]</sup> 进行扩增。反应条件为:95℃,5 min;95℃,45 s,57℃,30 s,72℃,1.5 min,30 cycles;72℃,7 min。回收 PCR 扩增产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.4.2 系统进化树分析:将所得序列提交 GenBank 数据库( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> ),申请基因登陆号,同时进行 Blast 比对,获取最相近标准菌株的 16S rRNA 基因序列,利用 MEGA 4.0 软件包采用邻接法( Neighbor-Joining )<sup>[13]</sup> 进行系统进化树的构建及多样性分析。

2 结果

2.1 菌株分离结果

采用 1.2 的方法进行菌株分离,共得到菌株 27 株,编号分别为 HY1-27。

2.2 菌株部分生理生化特征

对各菌株进行革兰氏染色,并进行淀粉酶、酯酶、纤维素酶及 NaCl 浓度耐受的测定,其结果如表 1 所示。革兰氏染色结果表明:5 株菌为革兰氏阴性,其余为革兰氏阳性;酶活测定结果表明:15 株菌具有淀粉酶活性,9 株菌具有酯酶活性,9 株菌具有纤维素酶活性;NaCl 耐受浓度测定结果显示:NaCl 浓度为 2% 时所有菌株均能生长,5% 时能生长的有 22 株,15% 时能生长的有 1 株。

表 1 各菌株革兰氏染色、产酶及 NaCl 耐受浓度测定  
Table 1 Characteristics of gram-staining, enzyme-producing and salt-tolerance of the bacteria isolated from *Populus Euphratica* Forest in the hinterland of Taklimakan Desert

Strain	Gram	Amylase	Esterase	Cellulase	NaCl tolerance		
					2%	5%	15%
HY1	-	-	-	+	+	-	-
HY2	+	+	-	+	+	+	-
HY3	+	+	+	+	+	+	-
HY4	-	-	-	+	+	+	-
HY5	+	+	-	-	+	+	-
HY6	+	+	-	-	+	+	-
HY7	+	-	-	-	+	+	-
HY8	+	+	+	-	+	+	-
HY9	-	+	+	-	+	+	-
HY10	-	-	+	-	+	-	-
HY11	+	-	+	+	+	+	-
HY12	+	-	+	-	+	+	-
HY13	+	+	+	+	+	+	-
HY14	+	+	-	-	+	-	-
HY15	+	+	-	-	+	+	-
HY16	+	+	-	-	+	-	-
HY17	+	+	-	-	+	+	-
HY18	+	-	-	-	+	-	-
HY19	-	+	-	-	+	+	+
HY20	+	+	-	-	+	+	-
HY21	+	+	+	+	+	+	-
HY22	+	-	-	-	+	+	-
HY23	+	-	-	-	+	+	-
HY24	+	+	+	+	+	+	-
HY25	+	-	-	-	+	+	-
HY26	+	-	-	-	+	+	-
HY27	+	-	-	+	+	+	-

+ :Positive; - :Negative.

2.3 16S rRNA 基因扩增及系统进化分析  
以各菌株基因组 DNA 为模板进行 16S rRNA 基因扩增并进行测序,所得序列申请 Genbank 基因登录号( HM579792-HM579818 ),并采用 MEGA 4.0 软件绘制系统进化树( 图 1 )。结果表明,27 株菌分属于 13 个属。其中链霉菌属( *Streptomyces* ) 最多,有 6 株;其次为考克氏菌属( *Kocuria* ),有 5 株;芽孢杆菌属( *Bacillus* ) 4 株,居第三位;其余菌属各有 1 - 2

株,分别为:假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、糖多胞菌属 (*Saccharopolyspora*)、固氮螺菌属 (*Azospirillum*)、*Caenibacterium*、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、动性球菌属 (*Planococcus*)、*Pontibacter*、原小单胞菌属 (*Promicromonospora*)。

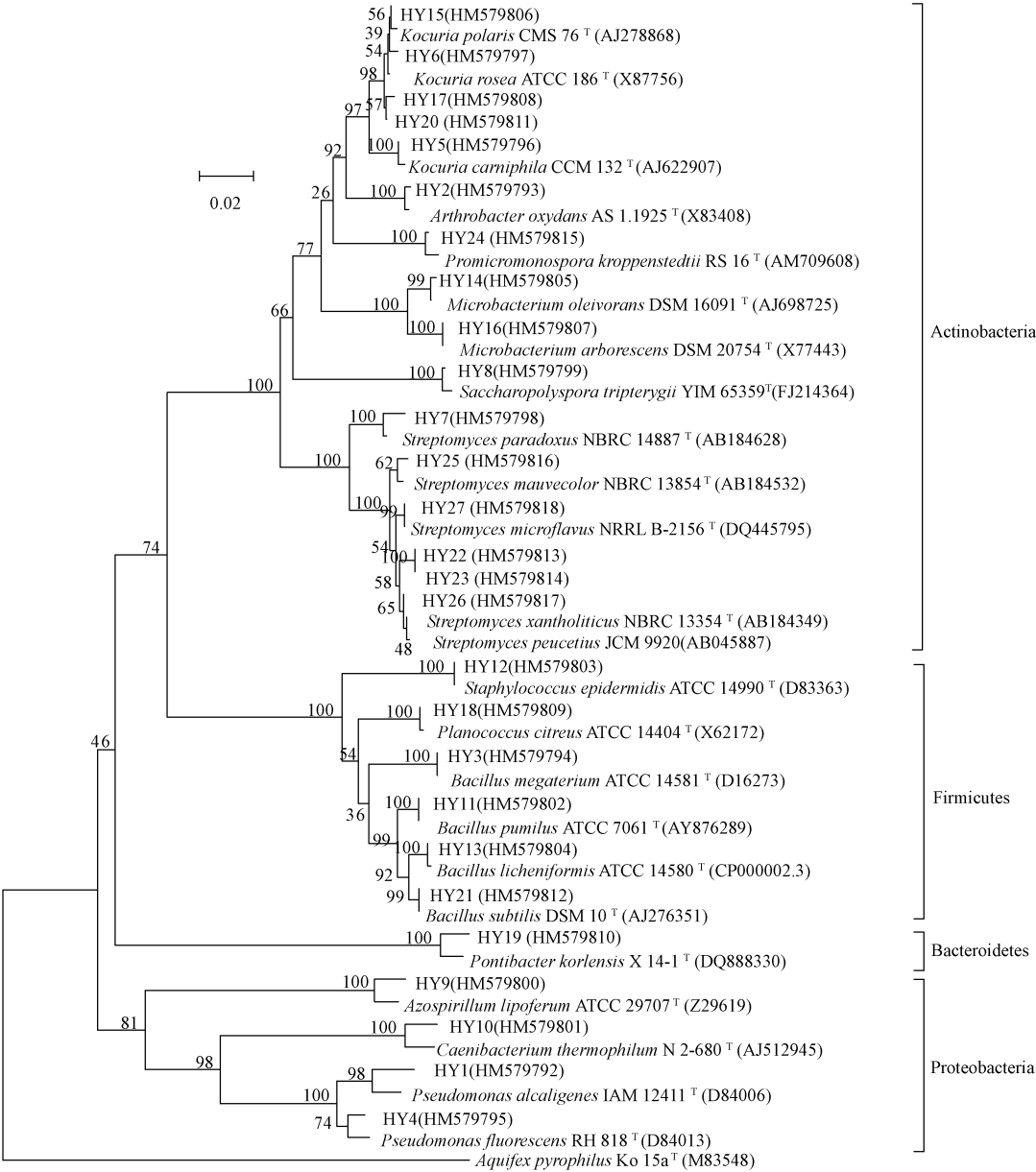


图 1 各菌株系统发育树状关系图

Fig. 1 Phylogenetic tree of the bacteria isolated from *Populus Euphratica* Forest in the hinterland of Taklimakan Desert. The phylogenetic tree constructed by the Neighbor-Joining method based on the 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar,2% sequence divergence. *Aquifex pyrophilus* is an outgroup.

3 讨论

目前有关塔克拉玛干沙漠腹地微生物多样性的

报道极少,其微生物多样性有待进一步探索。本研究采用了两种培养基对该地细菌多样性进行初步分析,结果表明,从该地分离的 27 株菌分属于 13 个

属,说明该地微生物种类比较丰富。另外,周智彬等研究表明<sup>[5]</sup>,塔克拉玛干沙漠腹地防护林土壤微生物中放线菌少于其它细菌,而本研究中放线菌数量多于其它细菌。究其原因,可能是分离方法不同,或是采样地点有差异,也可能是因为随着时间变迁,微生物群落发生了改变,因此有必要对该地微生物的分离方法、分离程序及培养条件等进行全面探索,并可分时段、分地点从该地采样,从而了解气候变化或其它因素对该地微生物群落的影响。

研究表明,新疆盐碱环境是筛选天然生理活性物质产生菌的重要地区<sup>[14-16]</sup>。本研究所分离获得的微生物中,菌株 HY26 与柔红霉素产生菌波赛链霉菌(*Streptomyces peucetius*)<sup>[17]</sup>(NBRC 13354)、菌株 HY27 与螺旋霉素产生菌细黄链霉菌(*Streptomyces microflavus*)<sup>[18]</sup>(NRRL B-2156)同源性均为 99%。因此,今后可以对所分离菌株进行生理活性物质测定,以期从中获得天然生理活性物质产生菌。

另外,本研究对菌株进行了三种酶活性测定,结果显示,所有菌株均具有一种以上的酶活性。表明所分离菌株具有一定的实用价值,如纤维素酶活性较强的菌株可用于制作生物饲料、生物肥料等等。因此下一步可对所分离菌株进行开发利用,同时可对其酶学性质进行更深入的研究,以期获得更多可为生产实践所用的菌株。

## 参考文献

- [1] <http://baike.baidu.com/view/26598.htm>.
- [2] 许浩,张希明,闰海龙,孙红叶,单立山.塔克拉玛干沙漠腹地梭梭(*Haloxylon ammodendron*)蒸腾耗水规律.生态学报(*Acta Ecologica Sinica*),2008,28(8):3713-3720.
- [3] Pointing SB, Chan YK, Donnabella CL, Lau MCY, Jurgens JA, Farrell RL. Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,2009,106:19964-19969.
- [4] 颇峰雪,文启凯,伯荣,杨玉锁.塔克拉玛干沙漠腹地人工植被下土壤微生物的初步研究.生物多样性(*Chinese Biodiversity*),2000,8(3):297-303.
- [5] 周智彬,李培军.塔克拉玛干沙漠腹地人工绿地土壤中微生物的生态分布及其与土壤因子间的关系.应用生态学报(*Chinese Journal of Applied Ecology*),2003,14(8):246-1250.
- [6] 单娜娜,潘伯荣,文启凯,罗明,赖波.塔克拉玛干沙漠腹地人工绿地土壤微生物生态学特性研究.干旱区研究(*Arid Zone Research*),2001,18(4):52-56.
- [7] 靳正忠,雷加强,徐新文,李生宇,赵思峰.极端干旱区防护林地土壤微生物多样性.生态学报(*Acta Ecologica Sinica*),2009,29(8):4548-4559.
- [8] 马小龙,王芸,杨红梅,王纯利,毛培宏,金湘,常玮,房世杰,张评浒,娄恺.新疆泥火山产酶嗜盐放线菌的筛选及多样性.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*),2008,48(8):1001-1005.
- [9] 周德庆.微生物学教程.第一版.北京:高等教育出版社,1993.
- [10] 顾美英,谢玉清,唐琦勇,张志东,房世杰,包慧芳,茆军.低温污水中耐冷微生物的筛选及多样性分析.微生物学通报(*Microbiology*),2009,36(10):1483-1487.
- [11] Kim SB, Yoon JH, Kim H, Lee ST, Park YH, Goodfellow MA. Phylogenetic analysis of the genus *Saccharomonospora* conducted with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*,1995,45:351-356.
- [12] Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. *Applied and Environmental Microbiology*,2000,66(7):2943-2950.
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*,1987,4:406-425.
- [14] 陈义光,姜怡,李文均,崔晓龙,徐丽华.青海盐碱环境中具抗肿瘤活性放线菌的筛选和多样性研究.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*),2007,47(5):757-762.
- [15] 李文均,唐蜀昆,王栋,徐丽华,姜成林.新疆青海中度嗜盐放线菌生物多样性初步研究.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*),2004,44(1):1-7.
- [16] 姜怡,李文均,徐平,唐蜀昆,徐丽华.盐碱环境放线菌多样性研究.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*),2006,46(2):191-195.
- [17] Madduri K, Hutchinson CR. Functional characterization and transcriptional analysis of the DnrR1 locus, which controls daunorubicin biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *Journal of Bacteriology*. 1995,177(5):1208-1215.
- [18] <http://baike.baidu.com/view/2021042.htm>.

# Bacteria diversity of soil of *Populus Euphratica* Forest in the hinterland of Taklimakan Desert

Huifang Bao, Wei Wang<sup>\*</sup>, Ning Wang, Shijie Fang, Faqiang Zhan

Institute of Microbiology of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China

**Abstract:** [ **Objective** ] The aim of study was to investigate bacterial diversity of *Populus Euphratica* forest in the hinterland of Taklimakan desert. All the isolates were used as inoculants for silage and biofertilizer. [ **Methods** ] Strains were isolated by culture-dependent method. Gram staining, NaCl tolerance, enzyme activity ( including amylase, esterase, cellulase ) were determined by standard methods. Phylogenetic trees based on 16S rRNA gene sequences were constructed by using the neighbour-joining. [ **Results** ] A total of 27 strains were obtained. Phylogenetic analysis of the bacterial 16S rRNA gene showed that all isolates fell into one of the following four bacterial lineages: Actinobacteria ( 16 strains ), Proteobacteria ( 4 strains ), Firmicutes ( 6 strains ) and Bacteroidetes ( 1 strains ). Gram staining indicated that 5 strains were gram-negative and the others were gram-positive. Among these, 15 strains showed amylase activity, 9 strains showed esterase activity and 9 strains showed cellulase activity. All strains growth occurred at in presence of 2% NaCl, 22 strains growth occurred at in presence of 5% NaCl and only 1 strain tolerated up to 15% NaCl. [ **Conclusion** ] The bacterial population diversity is abundant in soil of *Populus Euphratica* Forest in the hinterland of Taklimakan Desert, which is worthy of further investigation.

**Keywords:** Taklimakan Desert, *Populus Euphratica* Forest, Bacteria, Diversity

( 本文责编:王晋芳 )