

可可西里土壤样品中细菌多样性的分析

苏进进 张玉琴 孙莹 靳蓉 赵莉莉 王宇 陈杰 苏静 余利岩*

(中国医学科学院 北京协和医学院医药生物技术研究所 北京 100050)

摘要: 采用纯培养和免培养相结合的方法对来源于可可西里的一份土壤样品中的细菌多样性进行了初步研究。纯培养实验使用了6种分离培养基,共得到细菌19株,其中放线菌7株,非放线菌细菌12株。这些菌株分别属于叶杆菌属(*Phyllobacterium*)、贪食菌属(*Variovorax*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、小月菌属(*Microlunatus*)、原小单胞菌属(*Promicromonospora*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)8个属。免培养分析采用基于通用引物PCR扩增的细菌16S rRNA基因文库的方法以及变性梯度凝胶电泳(DGGE)。16S rRNA基因文库分析结果表明,该土壤样品细菌群落可划分为19个OTUs,分属于5个不同纲,优势顺序为 β -Proteobacteria (75%), α -Proteobacteria (9%), γ -Proteobacteria (7%), Actinobacteria (7%), Firmicutes (2%)。变性梯度凝胶电泳分析表明,该样品细菌多样性指数 Shannon-wiener index 为2.68,表明其中微生物多样性较低,这可能和其所处的极端环境有一定关系。比较纯培养和免培养的实验结果发现,土壤中的一些优势细菌并没有被有效地分离,需要在针对特定微生物设计特定培养基及培养条件进行选择性地分离上做更多的探索研究。

关键词: 可可西里, 纯培养, 免培养, ARDRA, 16S rRNA 基因文库, DGGE

Diversity of culturable and unculturable bacteria in soil samples from Hoh Xil, China

SU Jin-Jin ZHANG Yu-Qin SUN Ying JIN Rong ZHAO Li-Li WANG Yu
CHEN Jie SU Jing YU Li-Yan*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Hoh Xil that is situated at the Yushu Tibetan Autonomous Region in southwest Qinghai, is one of the most primitive and well-preserved natural environment in the world. The microbial diversity in this area is largely unknown till date. In the present study an attempt has been made to explore the microbial diversity using both of cultivation-dependent and independent approaches. In the cul-

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30870026); “重大新药创制”科技重大专项(No. 2009ZX09301-003, 2009ZX09302-004)

* 通讯作者: Tel: 86-10-63187118; ✉: yuliyang_2000@yahoo.com

收稿日期: 2010-11-02; 接受日期: 2010-11-15

ture-dependent experiment, 19 isolates were obtained from the soil sample IMB08-049. 16S rRNA gene sequence analysis showed that the 19 strains belonged to 8 different genera, including *Phyllobacterium*, *Variovorax*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Microlunatus*, *Kribbella*, *Promicromonospora* and *Bacillus*. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis revealed 17 V3 fragments of 16S rRNA gene from sample IMB08-049. Biodiversity was also assessed by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), DNA sequencing and phylogenetic analysis, respectively. 19 operational taxonomic units (OTUs) were clustered in the following phyla including *Proteobacteria* (91%), *Actinobacteria* (7%) and *Firmicutes* (2%). Comparison of the results from culture-dependent and culture-independent suggests that some dominant species were not isolated using the above culture-dependent method, and that new isolation method should be developed to discover more bacteria exciting.

Keywords: Hoh Xil, Culture-dependent, Culture-independent, ARDRA, 16S rRNA gene library, DGGE

过去的 150 年, 研究者们从微生物次级代谢产物获得多种微生物药物^[1], 但是微生物分子生态学的研究表明, 自然界中只有很少部分的微生物得到了纯培养^[2], 绝大多数的微生物是未被开发的和未知的^[3], 因此探索和培养那些未知的微生物物种将会为创新微生物药物的筛选提供新的菌种资源。

极端环境微生物可以产生工业用酶和生理活性物质, 具有很好的工业用途^[4], 它们在长期进化过程中形成了独特的生物活性物质合成途径或代谢途径、新的调控机制以及与这些生理生化特性有关的新基因, 具有特殊的代谢类型, 并且能够产生许多具有特殊功能的生理活性物质^[5]。可可西里被誉为“生命的禁区”, 寒冷、少雨、辐射强、多大风是可可西里地区的气候特点^[6], 其土壤中微生物多样性很少被研究。为了更好地了解极端环境样品中微生物的多样性, 本实验以来自于可可西里海拔 4 759 m 的鹰咀山前沙地的一份土壤样品为研究对象。

目前, 分子生物学技术已经广泛用于微生物生态学的研究。16S rRNA 依据其保守性和特异性在系统发育研究中具有重要作用, 16S rRNA 基因文库是微生物分子生态学中用来调查环境中原核微生物组成的常用方法之一^[7], 能够较全面和系统地揭示各种生态环境中前所未有的微生物多样性。本文构建了基于通用引物 PCR 扩增的细菌 16S rRNA 基因克隆文库, 并进行了基因扩增片段的限制性酶切和文库分析(ARDRA, Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)。另外, 还对土壤中细菌 16S rDNA V3

区进行变性梯度凝胶电泳分析, 初步对样品中细菌群落有了一定的认识, 同时也用本实验室常规的 6 种培养基对样品中的微生物进行了分离研究。对比两种方法的实验结果, 可以了解到那些存在而未被培养的微生物的相关信息, 从而为设计特定培养基、有针对性地分离特定微生物提供参考和启示。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品: 样品 IMB08-049 采自可可西里鹰咀山前沙地, 地理位置为东经 86°01', 北纬 36°04', 海拔 4 759 m。

1.1.2 培养基: 纤维素培养基(g/L): 纤维素 2, 干酪素 0.3, 琼脂粉 15, 微量盐溶液 1 mL, pH 7.2; 木聚糖培养基(g/L): 木聚糖 10, 干酪素 0.3, 微量盐溶液 1 mL, 制霉菌素 0.05, pH 7.2; 棉子糖培养基(g/L): 棉子糖 5.0, 组氨酸 1.0, 琼脂粉 15, 微量盐溶液 1 mL, 制霉菌素 0.05, pH 7.2; 丙酸钠-无机盐培养基(g/L): 丙酸钠 2, K₂HPO₄ 0.05, KNO₃ 0.1, NaCl 0.5, FeSO₄ 0.01, 植物凝胶 10, 制霉菌素 0.05, pH 7.2; ISP2 (g/L): 酵母膏 4.0, 麦芽汁 10.0, 葡萄糖 4.0, NaCl 1.0, 琼脂粉 15, 制霉菌素 0.05, pH 7.0-7.4; 1/5 R₂A (g/L): 酵母粉 0.1, 胰蛋白胨 0.05, 蛋白胨 0.15, 葡萄糖 0.1, 淀粉 0.1, K₂HPO₄ 0.05, MgSO₄ 0.005, 丙酮酸钠 0.06, 琼脂粉 15, 制霉菌素 0.05, pH 7.2。

1.1.3 主要仪器和试剂: GEM-T Easy Vector Sys-

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

tems 和连接试剂购自 Promega 公司, DNA 纯化试剂盒购自 Qiagen 公司, 去离子甲酰胺(默克), 尿素(默克), 丙烯酰胺(Sigma), 甲叉二丙烯酰胺(Sigma), PCR 扩增引物合成和产物测序由上海生物工程技术服务有限公司完成, 感受态细胞和 PCR 扩增体系购自全式金公司, 琼脂糖凝胶电泳仪(北京六一仪器厂), 变性梯度凝胶电泳仪(Bio-Rad), Typhoon 多功能激光扫描成像系统(GE)。

1.2 方法

1.2.1 纯培养: (1) 菌株分离和纯化: 称取土壤样品 2 g 于 18 mL 5 mmol/L 的无菌磷酸缓冲液(0.01%植物凝胶, 0.1%焦磷酸钠, 0.85% NaCl+氯胺-T 1.0%, pH 7.0)溶液中, 28 °C、170 r/min 振荡 40 min, 然后用生理盐水稀释至 10^{-1} 和 10^{-2} 倍, 将稀释好的土样涂在分离培养基上, 在 28 °C 和 10 °C 培养 10–20 d, 挑取单菌落至 ISP2 (酵母膏 4.0 g, 麦芽汁 10.0 g, 葡萄糖 4.0 g, 1.5%琼脂, H₂O 1 000 mL, pH 7.0)斜面上。

(2) 16S rRNA 基因扩增及测序: 获得纯培养物后, 用无菌竹签挑取单菌落于 50 μ L 5% (W/V) 的 chelex-100 的溶液中, 微波处理加热 90 s, 离心 5 min, 取 1 μ L 上清液作为模板, 以 27F: 5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3', 1495R: 5'-CTACGGCTA CCTTGTTACG-3'^[9]为扩增引物进行 16S rRNA 基因扩增, PCR 反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。产物送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。

1.2.2 免培养: (1) 总 DNA 的提取。参考《土壤微生物分子生态研究中总 DNA 的提取》^[8]方法 B。

(2) 16S rRNA 基因文库的构建。1) 16S rRNA 基因扩增: 取 1 μ L 总 DNA 作为模板进行 PCR, 引物为 27F^[9]: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1495R: 5'-CTACGGCTACCTTGTTACG-3', PCR 采用 50 μ L 反应体系, 扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测产量和特异性, 并用 DNA 纯化试剂盒纯化。2) 连接、转化和克隆文库构建: 纯化之后的 PCR 扩增产物使用 pGEM-T

Easy vector System 试剂盒(Promega)连接, 连接产物转入感受态细胞大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α ^[10], 用 Amp-X-gal/IPTG 抗性筛选平板选择具有氨苄抗性的白色克隆转化子, 然后用菌落 PCR 的方法检查插入片段的大小, 引物用 T7 和 SP6, 扩增条件参照分子克隆方法, 选取的片段大小在 1 700 bp 左右(扩增片段除了包括 1 500 bp 左右的 16S rRNA 基因序列外, 还包括两端载体上的序列共 178 bp)。

3) ARDRA 分析和测序: 对已经通过 SP6 和 T7 验证的阳性克隆质粒分别用 *Afa* I 和 *Hae* III^[11]两种限制性内切酶(TaKaRa 公司)进行酶切分型, 每个 ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)带型视为一个 OTU (Operational Taxonomic Unit), 从每个 OTU 中选取 1–3 个克隆进行测序。

4) 文库分析: 测序结果排除反向插入序列后用 Pintal 在线程序剔除嵌合体序列。将代表序列输入 GenBank 数据库比对, 再用 ClustalX 和 MEGA 4.0 软件对比对结果进行系统发育学分析, 系统发育树算法为 Neighbor-Joining, 采用 Kimura 双参数计算模型。Coverage C 按公式 $C=[1-(\text{带型仅出现 1 次的克隆子数/总克隆数})]\times 100\%$ ^[12]计算。OTU1–OTU19 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 核苷酸数据库中的存取号分别为 HM104441–HM104459。

(3) 变性梯度凝胶电泳。1) 16S rRNA V3 区基因扩增: 取 1 μ L 总 DNA 作为模板进行 PCR, 引物为 V338F: 5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGG GGCGGGGGCACGGGGGG2ACTCCTACGGGAGG CAGCAG-3', V534R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTG G-3', PCR 采用 50 μ L 反应体系, 扩增程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C–65 °C 1 min, 72 °C 1 min, 20 个循环; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 10 个循环; 72 °C 7 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测产量和特异性, 并用 DNA 纯化试剂盒纯化。

2) 电泳及染色: 配置变性梯度为 30%–60%的聚丙烯酰胺梯度凝胶, 用 6 \times 蔗糖上样缓冲液上样, 在 60 °C、120 V 条件下电泳 12 h, 然后将聚丙烯酰胺凝胶在 1 \times TAE 中用 SYBR Green I 染色 30 min, Typhoon 多功能激光扫描成像系统对其成像。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

2 结果

2.1 纯培养结果

使用 6 种培养基从土壤样品 IMB08-04 中共分离得到细菌 19 株, 其中放线菌 7 株, 非放线菌细菌 12 株。本研究还通过 16S rDNA 序列测定对样品 IMB08-049 中的分离株进行了排重, 并对微生物的多样性进行了分析。结果发现所分离到的 19 个菌株各不相同, 分别属于 γ -变形杆菌亚门中的假单胞属 (21%)、 α -变形杆菌亚门中的叶杆菌属 (11%)、 β -变形杆菌亚门的贪食菌属 (11%)、厚壁菌门中的芽孢杆菌属 (21%) 以及放线菌门 (36%) 中的链霉菌属、小月菌属、原小单胞菌属、韩国生工菌属等, 测序结

果见表 1。从表中可以看出, 所分离到的放线菌较其它细菌种属丰富一些, 这与本研究中使用了较多的适于放线菌生长的分离培养基以及添加了抑制革兰氏阴性细菌和低 G+C 含量的革兰氏阳性细菌生长的抗生素有关。

2.2 免培养结果

2.2.1 样品总 DNA 提取和 16S rRNA 基因及 16S rRNA 基因 V3 区的扩增结果: 电泳结果表明土壤样品细菌总 DNA 片段大小约为 20 kb, 可用于 16S rRNA 基因的扩增模板, 扩增后的 16S rRNA 基因 PCR 产物长度约为 1 500 bp (图 1), 16S rRNA 基因 V3 区 PCR 产物长度约为 230 bp (图 2)。

表 1 可可西里土壤样品 IMB08-049 中分离株的 16S rRNA 基因序列分析结果
Table 1 Results of 16S rRNA gene sequences of strain isolated from soil Hoh Xil IMB08-049 sample

群组 Group	编号 Number	近源菌 Closest cultured relatives	相似性 Similarity (%)	比例 Proportion (%)
α -Proteobacteria	I09B-00170	<i>Phyllobacterium catacumbae</i> (AY636000)	100	11
	I09B-00172	<i>Phyllobacterium album</i> (EU438907)	100	
β -Proteobacteria	I08B-00804	<i>Variovorax boronicumulans</i> (AB300597)	99	11
	I09B-00171	<i>Variovorax paradoxus</i> (D88006)	99	
γ -Proteobacteria	I09B-01970	<i>Pseudomonas saccharophila</i> (AB021407)	99	21
	I09B-01805	<i>Pseudomonas</i> sp. (AB506040)	99	
	I09B-01803	<i>Pseudomonas fluorescen</i> (GU198127)	99	
	I09B-01812	<i>Pseudomonas synxantha</i> (GU186110)	100	
Actinobacteria	I09A-01607	<i>Streptomyces virens</i> (AB184713)	100	36
	I09A-02008	<i>Streptomyces asterosporus</i> (AY999902)	99	
	I09A-02003	<i>Streptomyces calvus</i> (AY999780)	99	
	I09A-00149	<i>Microlunatus</i> sp. (FN556016)	98	
	I09A-01604	<i>Kribbella alba</i> (AY082062)	99	
	I09A-02002	<i>Kribbella flavida</i> (AY253863)	99	
Firmicutes	I09B-00173	<i>Bacillus altitudinis</i> (AJ831842)	100	21
	I09B-00169	<i>Bacillus idriensis</i> (AY904033)	99	
	I09B-00166	<i>Bacillus pumilus</i> (AY876289)	99	
	I09B-00165	<i>Bacillus stratosphericus</i> (AJ831841)	99	

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

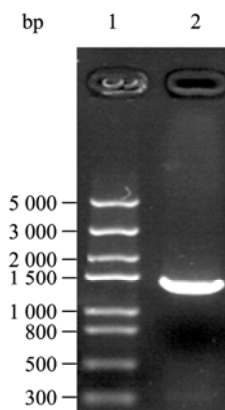


图1 16S rRNA 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 1 The electrophoresis of 16S rRNA PCR result

注: 1: Marker III; 2: 16S rRNA PCR 产物.

Note: 1: Marker III; 2: 16S rRNA PCR product.

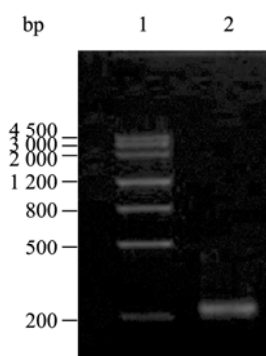


图2 16S rRNA V3 区基因 PCR 产物电泳

Fig. 2 The electrophoresis of 16S rRNA V3 gene PCR product

注: 1: Marker 3; 2: 16S rRNA V3 区 PCR 产物.

Note: 1: Marker 3; 2: 16S rRNA V3 region PCR product.

2.2.2 DGGE 分析结果: 细菌 16S rRNA V3 区基因的 DGGE 电泳图谱见图 3A。样品 IMB08-049 的电泳图谱中可清晰分辨的条带共有 17 条(图 3B), 由 Quantity One 分析软件得出的模拟图也表明同样的结果。

根据各个条带的灰度、迁移率的不同, 用软件 Quantity One 计算出土壤样品 IMB08-049 的细菌多样性指数、丰度、均匀度指数见表 2。从表 2 可见, 来自于极端环境可可西里的土壤样品 IMB08-049 中细菌多样性指数香浓-威纳为 2.68, 丰富度为 17, 显示其中细菌的多样性较低。土壤样品 IMB08-049 细菌群落均匀度为 0.95, 表明其中各物种个体数目分配的均匀程度均较差。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

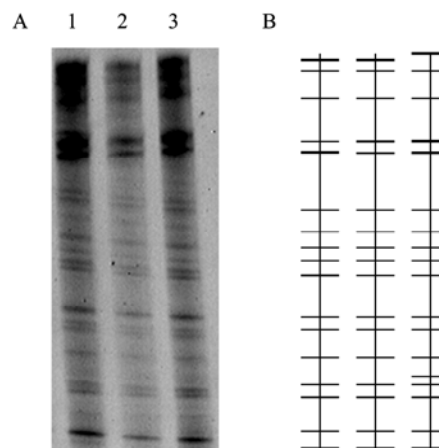


图3 土壤样品细菌 DGGE 电泳条带(A)及其模拟图(B)

Fig. 3 DGGE band pattern of the bacteria from soil sample IMB08-049 (A) and its simulation diagram (B)

注: 1: 上样量 25 μ L; 2: 上样量 15 μ L; 3: 上样量 20 μ L.

Note: 1: Loading amount 25 μ L; 2: Loading amount 15 μ L; 3: Loading amount 20 μ L.

表2 土壤样品 IMB08-049 中细菌 DGGE 条带多样性指数, 均匀度及丰富度

Table 2 Shannon-wiener index(H), Evenness(EH) and Richness(S) of the soil sample IMB08-049 by the DGGE band pattern

香浓-威纳指数 Shannon-wiener index	丰富度 Richness	均匀度 Evenness
2.68	17	0.95

2.2.3 16S rRNA 基因文库分析结果: 从转化平板上随机挑取 122 个克隆, 经菌落 PCR 验证, 得到 103 个正确插入长度的转化子。用 *Afa* I 和 *Hae* III 进行 ARDRA 分型共得到 19 种物理图谱类型, 每种类型选取 1-3 个克隆测序, 共得到 19 种类型的 DNA 片段, 没有发现嵌合体。克隆文库的 Coverage C 值为 74%, 表明克隆文库中基本代表样品中全部微生物的种类, 库容基本足够。

2.2.4 系统发育分析: 103 个克隆被分为 19 个 OTUs。结果表明, 103 个克隆中有 91% 隶属于变形菌门 (Proteobacteria), 其中 β -变形菌亚门 (β -Proteobacteria) 为绝对优势菌, 占 75%, α -变形菌亚门 (α -Proteobacteria) 占 9%, γ -变形菌亚门 (γ -Proteobacteria) 占 7%, 其余 9% 分别归属于放线菌门 (Actinobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes)。19 个 OTUs 中有 13 个 OTUs 的 16S rRNA 基因序列与

GenBank 数据库中已培养细菌的序列相似性高于 97%, 另外的 6 个与已培养或未培养的属种的 16S rRNA 基因相似性低于或等于 97%, 具体结果见表 3。

由 OTUs 代表克隆序列和 BLAST 中相似性最高菌株的 16S rRNA 基因序列绘制的系统进化树见图 4。

2.3 纯培养和免培养结果对比

对比 IMB08-049 纯培养和免培养结果可以看出, 纯培养和免培养的优势种群存在着明显的差异。免培养分析得到的优势种群中很多种属都没有得到纯培养, 尤其是优势群落 β -变形杆菌门中的一些属种。 α -变形菌亚门中只有叶杆菌属 (*Phyllobacterium*) 得到纯培养, 玫瑰杆菌属 (*Roseobacter*) 和 *Kaistobacter* 没有得到纯培养, β -变形菌亚门中贪食菌属 (*Variovorax*) 得到了纯培养, 红长命菌属 (*Rubrivivax*)、伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、

Curvibacter、*Mitsuaria*、*Azohydromonas*、*Aquabacterium*、*Pelomonas* 没有得到纯培养, γ -变形菌亚门中假单胞菌属得到了纯培养, 肠杆菌科的细菌没有得到纯培养, 厚壁杆菌门中的芽孢杆菌属得到了纯培养。放线菌门中纯培养分离得到的菌株相对种类较多, 小月菌属、链霉菌属、动孢菌属、原小单胞菌属的菌株都得到了纯培养。

对土壤样品 IMB08-049 的 DGGE 和 16S rRNA 基因文库研究结果表明, 相对于普通环境样品, 该样品中微生物多样性较低。通过对 DGGE 图谱中 3 个优势条带的测序表明(未显示结果), 它们所代表的细菌菌株分别可归属于 β -变形菌亚门 (β -Proteobacteria) 中的 *Burkholderia*、*Azohydromonas* 和 *Rubrivivax*。DGGE 电泳中 3 条优势条带的测序结果与 16S rRNA 基因文库中优势种群的分析结果具有很好的一致性。但对应的这 3 个 OTUs 在本研究的纯培养实验中均未获得分离培养。

表 3 可可西里土壤样品的 16S rRNA 基因克隆序列分析结果
Table 3 Phylogenetic affiliations of 16S rRNA gene clone sequences of soil samples obtained from Hoh Xil

代表 OTU Representative OTU	近源菌 Closest cultured relatives	相似性 Similarity (%)	克隆数 Number of clone	群组 Group	占总群百分数 Percent of total group (%)
OTU15	Uncultured <i>Kaistobacter</i> sp. (EU440703)	99	7	α -Proteobacteria	9
OTU18	<i>Phyllobacterium ifriqiyense</i> (FJ449663)	90	1		
OTU07	<i>Roseomonas ludipueritiae</i> (NR_028983)	100	2		
OTU03	<i>Burkholderia fungorum</i> (NR_025058)	90	34	β -Proteobacteria	75
OTU13	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> (EF651098)	96	8		
OTU01	<i>Curvibacter gracilis</i> (GU368379)	96	4		
OTU14	<i>Mitsuaria chitosanitabida</i> (FJ609679)	100	2		
OTU04	<i>Azohydromonas australica</i> (AB188124)	97	24		
OTU06	<i>Aquabacterium</i> sp. (FJ890906)	99	2		
OTU19	<i>Variovorax</i> sp. (FJ006917)	99	1		
OTU08	<i>Pelomonas soil</i> (EF660749)	96	1		
OTU05	Uncultured <i>Enterobacteriaceae</i> bacterium (EF562128)	92	5	γ -Proteobacteria	7
OTU11	<i>Serratia marcescens</i> (GQ855220)	100	2	Actinobacteria	7
OTU10	<i>Promicromonospora</i> sp. (U677784)	98	2		
OTU09	<i>Streptomyces aureus</i> (FJ532416)	100	2		
OTU02	<i>Microtholunatus</i> sp. (FJ529700)	99	1		
OTU12	<i>Kribbella</i> sp. (FJ817396)	98	1		
OTU17	<i>Actinokineospora</i> sp. (AB447489)	98	1		
OTU16	<i>Bacillus pumilus</i> (EU863189)	99	2	Firmicutes	2

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

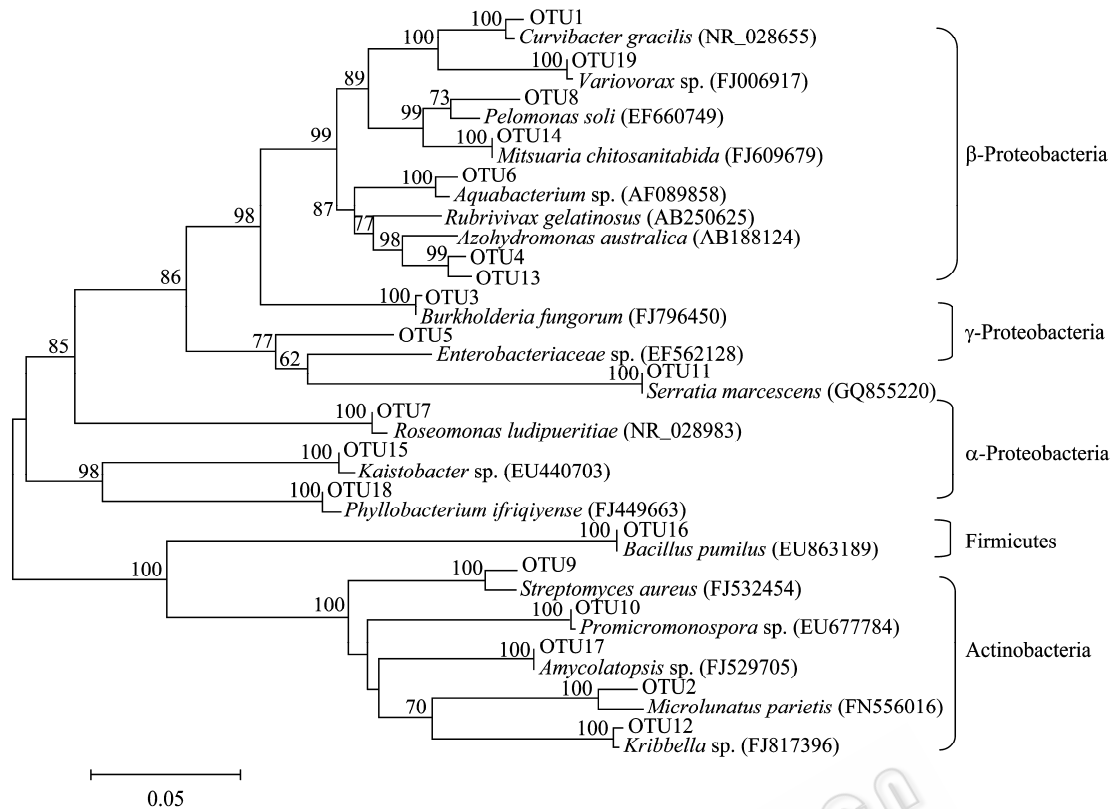


图 4 可可西里土壤样品 IMB08-049 中细菌的系统发育分析

Fig. 4 The phylogenetic analysis of the bacteria in soil sample of Hoh Xil

Note: Numbers at each branch points indicate the percentage supported by bootstrap based on 1 000 replicates. The GenBank accession number is showed in parentheses. Bar: 0.005 substitutions per nucleotide.

3 讨论

分子生物学研究表明,地球上存在极其丰富的微生物,细菌域可以分为大约 40 个门^[13],而且多数微生物从环境样品中未能培养出来^[14]。16S rRNA 基因的非培养技术可以更全面地展示特定生态系统的微生物多样性^[15]。本实验通过 6 种培养基分离可可西里土样得到 19 株菌,分布在 8 个属,其中属于小月菌属的放线细菌 CPCC100076^T 可能为新菌,正在鉴定中。纯培养分离培养时,平板上菌落较为单一,数量较少,可能和样品所处的极端环境有一定关系。通过构建土壤样品的 16S rRNA 基因文库克隆进行 ARDRA 分析表明,该样品的细菌多样性较低,和纯培养的结果较为一致,而且纯培养中分离的细菌可以在 16S rRNA 基因文库中得到体现。通过 DGGE 实验计算出来的多样性指数更进

一步说明了该极端环境样品中细菌多样性的问题。16S rRNA 比对和进化树分析表明,有 4 个 OTUs 完全未获得纯培养,这 4 个 OTUs 在文库中占的比例较大。对比纯培养和免培养的结果可发现, α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria 的细菌大多没被培养出来,而它们在群落中处于绝对优势地位。 γ -Proteobacteria 中的 *Enterobacteriaceae bacterium* 和 *Serratia marcescens* 也没有被培养出来,这可能和纯培养使用的培养基及培养条件有关系。本研究中的纯培养条件具有一定局限性,培养条件未针对厌氧细菌进行设计,同时所使用的培养基也多是针对放线菌设计的,适于非放线菌细菌分离的相对较少。因此,下一步我们将设计多个适于细菌的分离培养基并参考 DGGE 和 16S rRNA 基因文库等生态学分析结果,采用改进分离条件、设计分离培养基、添加合适的抗生素等方法定向分离其中生态学方

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

法检测到的优势种群,其中可能包括新的微生物菌种资源。

参 考 文 献

- [1] Courtois S, Cappellano CM, Ball M, et al. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 49-55.
- [2] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH, et al. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiol Rev*, 1995, 59(1): 143-169.
- [3] Hugenholtz P, Pitulle C, Hershberger KL, et al. Novel division-level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring[J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(2): 366-376.
- [4] 黎唯, 李一青, 李铭刚, 等. 极端环境微生物源活性物质的研究进展[J]. *国外医药: 抗生素分册*, 2007, 28(1): 1-5.
- [5] Schiraldi C, De Rosa M. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles[J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(12): 515-521.
- [6] 郭柯. 青海可可西里地区的植被[J]. *植物生态学与地植物学学报*, 1993, 17(2): 120-132.
- [7] Chen AC, Imachi H, Sekiguchi Y, et al. Archaeal community compositions at different depths (up to 30 m) of a municipal solid waste landfill in Taiwan as revealed by 16S rDNA cloning analyses[J]. *Biotechnology Letter*, 2003, 25(9): 719-724.
- [8] 赵勇, 周志华, 李武, 等. 土壤微生物分子生态学研究 中总 DNA 的提取[J]. *农业环境科学学报*, 2005, 24(5): 854-860.
- [9] Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, et al. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1978, 75(10): 4801-4805.
- [10] Sambrook J. *分子克隆实验指南*[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- [11] 潘海莲, 周成, 王红蕾, 等. 内蒙古锡林浩特地区嗜盐古菌多样性的研究[J]. *微生物学报*, 2006, 46(1): 1-6.
- [12] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters[J]. *Biometrika*, 1953, 40(3/4): 237-264.
- [13] Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT. New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4748-4755.
- [14] Zengler K, Toledo G, Rappé M, et al. Cultivating the uncultured[J]. *PNAS*, 2002, 99(24): 15681-15686.
- [15] Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, et al. Methods of studying soil microbial diversity[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 58(2): 169-188.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一,主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展,其内容要求新颖丰富,观点明确,论述恰当,应包含作者自己的工作内容和见解。因此,作者在动笔之前必须明确选题,一般原则上应选择 在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面,在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势,即掌握其内在的精髓,深入到专题研究的本质,论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望,提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外,作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法,辅以注释,客观而有少量评述,使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是:在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文,引用文献数量不限。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>