

研究报告

## 大兴安岭地区粘细菌资源的多样性及其生物活性

武志华<sup>1Δ</sup> 李娜<sup>1Δ</sup> 马秀枝<sup>2</sup> 董晔<sup>1</sup> 郭子文<sup>1</sup> 刘惠荣<sup>1\*</sup>

(1. 内蒙古农业大学生命科学学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

(2. 内蒙古农业大学林学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:**【背景】粘细菌是一类具有社会性行为的高等原核生物,其代谢产物具有丰富、多样、新颖的生物活性,是筛选天然药物的良好资源,具有很大的研究开发应用价值。【目的】分析大兴安岭地区粘细菌资源的多样性;分离纯化可培养的粘细菌,分析其抗菌活性并从中筛选对马铃薯晚疫病菌具有拮抗作用的菌株。【方法】通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术对从大兴安岭地区采集的15个土样中粘细菌资源的多样性进行分析,利用兔粪诱导、大肠杆菌划线诱导和滤纸诱导3种方法从土样中分离可培养的粘细菌,结合形态观察、生理生化特征和16S rRNA基因序列分析确定这些菌株的分类地位,通过平板对峙法对其进行抗菌活性分析。【结果】DGGE的分析结果显示,15个土样中共鉴定到13个属的粘细菌,基本覆盖了大部分已知的粘细菌种属以及部分未分类的粘细菌,表现出了丰富的多样性。共分离得到88株菌,从中得到22株纯菌,经鉴定属于2个属(粘球菌属与珊瑚球菌属)8个种(黄色粘球菌、橙色粘球菌、变绿粘球菌、珊瑚粘球菌、具枝粘球菌、大孢珊瑚球菌、弱小珊瑚球菌和珊瑚状珊瑚球菌)。抗菌结果显示:22株纯菌均表现出可以对一种甚至多种指示菌产生抗性,其中19株抑制大肠杆菌的生长,14株抑制马铃薯晚疫病菌的生长,8株抑制金黄色葡萄球菌的生长,13株抑制酿酒酵母菌的生长,7株抑制枯草芽孢杆菌的生长。【结论】内蒙古大兴安岭地区蕴藏着丰富的粘细菌资源,粘球菌属及珊瑚球菌属可能为该地区粘细菌菌群中的优势菌。分离纯化出的粘细菌菌株均表现出抑制一种甚至多种指示菌生长的活性,其中64%的纯菌对马铃薯晚疫病菌产生抗性,具有进一步研究的潜在价值。

**关键词:** 大兴安岭, 粘细菌, 多样性, DGGE, 抗菌活性

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31370058)

**\*Corresponding author:** E-mail: [huirong\\_liu@imau.edu.cn](mailto:huirong_liu@imau.edu.cn)

<sup>Δ</sup>These authors equally contributed to this work

**Received:** April 05, 2017; **Accepted:** June 16, 2017; **Published online** ([www.cnki.net](http://www.cnki.net)): June 30, 2017

基金项目: 国家自然科学基金(31370058)

**\*通信作者:** E-mail: [huirong\\_liu@imau.edu.cn](mailto:huirong_liu@imau.edu.cn)

<sup>Δ</sup>对本文贡献相同

收稿日期: 2017-04-05; 接受日期: 2017-06-16; 网络首发日期([www.cnki.net](http://www.cnki.net)): 2017-06-30

## Diversity and bioactivities of myxobacteria in Daxing'an Mountains

WU Zhi-Hua<sup>1Δ</sup> LI Na<sup>1Δ</sup> MA Xiu-Zhi<sup>2</sup> DONG Ye<sup>1</sup> GUO Zi-Wen<sup>1</sup> LIU Hui-Rong<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

(2. Forestry College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

**Abstract:** [Background] Myxobacteria are a group of higher prokaryotes with social behavior. They have great research value in screening natural drugs because their metabolites have rich, diverse and novel biological activities. [Objective] We studied the diversity of myxobacteria in Daxing'an Mountains of Inner Mongolia, and isolated and purified the culturable myxobacteria, and studied their antimicrobial activities and screened strains against *Phytophthora infestans*. [Methods] The diversity of myxobacteria was studied by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Culturable myxobacteria were isolated from 15 soil samples collected from Daxing'an Mountains by rabbit dung pellets inducing method, *Escherichia coli* inducing method, and filter paper inducing method. The purified strains were identified by morphological observation, physiological and biochemical characteristics, and the 16S rRNA gene sequence analysis. Then, the antimicrobial activities of the strains were determined by plate confrontation method. [Results] The results of DGGE showed that 13 genera of myxobacteria were identified from 15 soil samples, covering most of the known genera of myxobacteria and some of the unclassified myxobacteria. 88 strains were isolated in this study and 22 of them were purified. The purified strains belonged to two genera, *Myxococcus* and *Corallocooccus*, and 8 species, *Myxococcus xanthus*, *Myxococcus flavescens*, *Myxococcus virescens*, *Myxococcus coralloides*, *Myxococcus stipitatus*, *Corallocooccus macrosporus*, *Corallocooccus exiguus*, *Corallocooccus coralloides*. All of the purified myxobacterial strains exhibited one or more kinds of antimicrobial activities. 19 strains had the activity against *E. coli*. 14 strains had the activity against *Phytophthora infestans*. Eight strains showed the activity against *Staphylococcus aureus*. 13 strains had the activity against *Saccharomyces cerevisiae*. Seven strains showed the activity against *Bacillus subtilis*. [Conclusion] Myxobacterial resource in Daxing'an Mountains of Inner Mongolia is rich. *Myxococcus* and *Corallocooccus* could be the dominant populations of myxobacterial community in this region. The purified myxobacterial strains exhibited one or more kinds of antimicrobial activities and 64% of them have the activity against *Phytophthora infestans*, which has the potential value for further research in the future.

**Keywords:** Daxing'an Mountains, Myxobacteria, Diversity, DGGE, Antimicrobial activity

粘细菌是一种具有社会性行为、复杂多细胞行为和形态发生的革兰氏阴性细菌<sup>[1]</sup>。它具有显著的社会特征,例如能够在细胞间通过信号传导、感应、协同摄食、运动和形成子实体,所以粘细菌被认为是高等的原核生物<sup>[2]</sup>。粘细菌是所有细菌中基因组最大的,约为 10 Mb, DNA 的 G+C 含量为 67–72 mol%<sup>[3–6]</sup>。在营养缺乏等各种不利环境条件下,粘细菌会通过一个复杂的多细胞行为而形成肉眼可见的子实体,子实体通常形态各异,大小不等,多为亮黄色、红色、橙色、棕色或黑色等鲜艳颜色<sup>[7]</sup>。粘细菌作为一类可产生丰富次级代谢产物且产物具有高活性的微生物类群日趋受到重视。与

其他细菌相比,粘细菌是一类“生活在真核生物边缘”的高等原核生物类群,能够产生众多结构新颖、作用水平层次多样和作用机制独特的生物活性物质<sup>[8]</sup>,具有抗癌、抗病毒<sup>[9]</sup>、抗真菌、抗细菌<sup>[10]</sup>等作用,已经成为生物活性次级代谢产物的“微工厂”<sup>[11]</sup>,目前粘细菌已成为国内外研究热点。

粘细菌能够形成对温度、干旱、辐射、盐胁迫均具有抗性的粘孢子,因而具有较高的环境适应力,广泛分布于全球各地的土壤中。除此之外,草食动物粪便、腐败植物表面、树皮、树叶表面甚至水体中也发现了粘细菌的存在<sup>[12]</sup>。但粘细菌的一些特性使其部分种属菌株很难从环境样

品中分离出来。传统分离方法在分离菌株种类上的局限性,使得研究者们对粘细菌的生态学研究并不深入,到目前为止对于土壤中粘细菌的丰度以及群落结构仍然未知。近几年,用于研究微生物生态多样性新方法的建立,使一些通过传统培养方法不能获得微生物的生态学研究成为可能<sup>[13]</sup>。在众多分子生物学方法中,变性梯度凝胶电泳(Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE)技术由于其成本低、快捷直观的优点成为应用最广泛的微生物多样性分析手段之一<sup>[14]</sup>。

本研究采样点位于内蒙古海拉尔市根河市,在内蒙古大兴安岭森林生态系统国家野外科学观测研究站试验区内(50°49′–50°51′N, 121°30′–121°31′E),地处大兴安岭中山地带。该区最高海拔 1 116 m,最低海拔 810 m,相对高差 200–300 m。山体北高南低,平均坡度 12°,河谷开阔常形成沼泽湿地,其原始林面积是 32 km<sup>2</sup>,实验区总面积为 110 km<sup>2</sup><sup>[15]</sup>。该地区属寒温带半湿润气候区,一年当中有 9 个月的平均气温在 10 °C 以下,只有不超过 1 个月时间的平均气温高于 22 °C。全年的平均温度是–5.4 °C,一年中气温最高可达 40 °C,极端最低气温可达到–50 °C。全年降水量中的 60% 都集中在七八月份,总降水量为 450–550 mm。土壤冻结状态从 9 月下旬持续到次

年的 5 月初,冻结时间长达 7 个多月。该区土壤以棕色针叶林土为主,土壤表层有较厚的枯枝落叶层,厚度可达 5–8 cm。土壤 pH 为 4.5–6.5,腐殖质层一般在 10 cm 左右。大兴安岭林区罕有人至,对其土壤中所含粘细菌的研究还未见报道,而且由于其落叶及枯木覆盖量大,土壤腐殖质含量高,推测其中可能粘细菌数量较多且种类比较丰富。

本研究从采集自内蒙古自治区大兴安岭地区的 15 份土壤样品中筛选粘细菌,通过形态特征、生理生化特征以及 16S rRNA 基因序列分析对纯化出的菌株进行分类鉴定,并对其进行抗菌活性的分析,而且通过变性梯度凝胶电泳技术对其多样性进行分析。以期丰富内蒙古地区粘细菌资源库,为该地区粘细菌的深入研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

在土壤的表层、腐烂的植物、堆肥、食草动物的粪便中以及水环境中都可以发现粘细菌<sup>[4]</sup>。本研究于内蒙古自治区大兴安岭地区代表不同森林经营利用方式(原始林、皆伐林、渐伐林)的地点,利用五点采样法对表层 5–20 cm 处土壤进行采集(表 1)。

表 1 样地基本信息

Table 1 The basic information of sample plots

样品 Samples	森林经营方式 Forest management	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Altitude (m)	坡位 Position	土壤类型 Soil type
1	原始林	50°56.7′N	121°30.0′E	836	西坡下位	针棕壤
2	渐伐林	50°55.4′N	121°30.6′E	798	东坡中位	针棕壤
3	渐伐林	50°54.4′N	121°30.6′E	817	东坡中位	针棕壤
4	皆伐林	50°54.4′N	121°31.4′E	798	阳坡下位	针棕壤
5	皆伐林	50°53.9′N	121°31.6′E	835	阳坡中位	针棕壤
6	皆伐林	50°51.1′N	121°30.9′E	770	阴坡中位	针棕壤
7	人工林	50°48.2′N	121°32.8′E	776	阴坡中位	针棕壤
8	无林地	50°47.8′N	121°32.5′E	726	阳坡中位	针棕壤
9	原始林	50°56.4′N	121°31.0′E	849	东坡中位	针棕壤
10	原始林	50°56.4′N	121°30.9′E	829	东坡中位	针棕壤
11	原始林	50°56.4′N	121°31.0′E	864	东坡中位	针棕壤
12	原始林	50°56.4′N	121°30.0′E	845	东坡中位	针棕壤
13	皆伐林	50°56.7′N	121°30.0′E	841	西坡中位	针棕壤
14	皆伐林	50°56.6′N	121°30.1′E	837	西坡中位	针棕壤
15	皆伐林	50°56.7′N	121°30.2′E	836	西坡中位	针棕壤

1.1.2 主要试剂和仪器

蔗糖, 广西凤塘生化股份有限公司; FeCl<sub>3</sub>、NaNO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、MgSO<sub>4</sub>等, 天津风船化学试剂科技有限公司。紫外分光光度计, 美国Beckman公司; 电热恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司; 高压蒸汽灭菌器, 上海三申医疗仪器有限公司; 电子pH计, 意大利HANNA仪器; 超净工作台, 苏州净化公司; 试管、滴定管、培养皿等玻璃仪器, 上海欧泉仪器有限公司。

1.1.3 培养基

VY/2 固体培养基、LB 液体培养基、VY/4 液体培养基、ST21CX 培养基、WCX 固体培养基、CAS 液体培养基、牛肉膏蛋白胨液体培养基、牛肉膏蛋白胨固体培养基、YPD 液体培养基、土豆固体培养基、黑麦培养基等参考文献[16]配制。

1.1.4 抗菌活性测定菌株

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ )、酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*), 均由本实验室提供。

1.2 土壤参数的测定

土壤样品水分的测定采用烘干法<sup>[17]</sup>, pH 值的测定参见生态学常用实验研究方法与技术<sup>[18]</sup>, 有效磷的测定采用 NaHCO<sub>3</sub> 浸提-钼锑抗比色法<sup>[19]</sup>, 速效钾的测定采用 NaNO<sub>3</sub> 浸提-四苯硼钠比浊

法<sup>[20]</sup>, 水解氮的测定采用碱解扩散法<sup>[21]</sup>, 有机质的测定采用重铬酸钾容量法(稀释热法)<sup>[22]</sup>。

1.3 土壤总 DNA 的提取及 DGGE 分析

土壤总 DNA 的提取参见 Yeates 等<sup>[23]</sup>方法。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 10 $\times$ PCR Buffer 5  $\mu$ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L) 各 0.4  $\mu$ L (表 2)<sup>[24]</sup>, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L, DNA 模板(80 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 无菌水 38.8  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 35 s, 65  $^{\circ}$ C 45 s (每一个循环退火温度降低 1  $^{\circ}$ C), 72  $^{\circ}$ C 50 s, 共 10 个循环; 94  $^{\circ}$ C 35 s, 55  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 50 s, 72  $^{\circ}$ C 10 min, 共 20 个循环。利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检查扩增的 DNA 片段, GCW1/802R 扩增产物长度在 450 bp 左右, GCW4/802R 扩增产物长度在 350 bp 左右。

使用 40% 聚丙烯酰胺凝胶, 45%–65% 变性梯度 [100% 变性梯度包含 40% (体积比) 甲酰胺和 7 mol/L 尿素]。用 50  $\mu$ L 注射器快速上样后, 于 60  $^{\circ}$ C 条件下 75 V 电泳 20 h。硝酸银染色 15 min 后, 用去离子水洗脱 10 min。扫描条带, 图像用 Quantity One 4.6.2 软件进行分析。比较不同样品中菌群的基因型差异: 香农指数、丰富度以及均匀度等指标被用来比较各个样品的粘细菌多样性。

计算公式为: 香农指数  $H' = -\sum_{i=1}^S P_i \ln P_i$ ; 丰富度  $R=S$ ; 均匀度  $E = H'/H_{\max} = H'/\ln S$ 。

表 2 粘细菌多样性分析所需的引物

Table 2 Primers used in the diversity analysis of myxobacteria

引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	位置 Position*	特异性 Specific
GCW1	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGC ACGGGGGGCCCGTGTGTGATGAAGGTC	399–418	Cystobacterineae, Nannocystinea
GCW4	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGC ACGGGGGGTTAGCAAGCACCGGCTAAC	492–510	Sorangineae
802R	ACTACCAGGTATCTAATCCTG	/	General primer
W1	CCGCGTGTGTGATGAAGGTC	399–418	Cystobacterineae, Nannocystinea
W4	TTAGCAAGCACCGGCTAAC	492–510	Sorangineae

Note: \*: Correspond to the sequence number of 16S rRNA gene in *Escherichia coli*; /: Its position can not be determined.

用酒精棉擦拭刀片后灼烧, 待其冷却后将目的条带从凝胶上切下, 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 去离子水, 颠倒洗涤条带, 3 000 r/min 离心 1 min 后弃掉去离子水, 重复该步骤 2 次。然后加入 40  $\mu$ L 1 $\times$ TE 缓冲液, 将离心管置于 4  $^{\circ}$ C 过夜。以上清液为模板, 以不带 GC 夹的引物进行相同条件和体系的扩增, 所得 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接后转入大肠杆菌, 然后挑取单克隆进行菌落 PCR 后送北京华大公司测序。将所得测序结果于 NCBI 数据库的 BLAST 程序进行分析及相似性比较, 并下载相似性最高的核酸序列, 利用 ClustalX 2.0 程序进行比对后, 利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 进行系统发育分析。

## 1.4 粘细菌的分离

### 1.4.1 土壤样品的预处理

将经自然风干且过 60 目筛后的土壤样品于 58  $^{\circ}$ C 下烘 30 min 除去耐热性较差的杂菌, 取大约 30 g 的土壤样品置于高温高压灭菌后的 90 mm 培养皿内, 用终浓度为 100  $\mu$ g/mL 的放线菌酮溶液于室温下浸泡过夜, 除去部分霉菌和酵母菌。

### 1.4.2 兔粪诱导法

将经过预处理的土样倒入 ST21CX 固体培养皿中, 并使其铺平, 将 3 颗灭菌兔粪球半埋入其中, 于 30  $^{\circ}$ C 培养箱中恒温培养 6 d 后, 持续观察粘细菌子实体的形成。

### 1.4.3 大肠杆菌划线诱导法

将 20  $\mu$ L *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  菌液接入 200 mL 灭菌的 LB 液体培养基内, 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡过夜, 次日将 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  以 4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 15 min 后取菌体沉淀于 WCX 培养基上划 3 条均匀且厚的平行线, 晾干。挑取黄豆大小的预处理土样置于 3 条平行线的一端, 封口, 于 30  $^{\circ}$ C 培养箱中恒温培养。

### 1.4.4 滤纸诱导法

在 ST21CX 培养基上铺一张已灭菌的滤纸作为唯一碳源和能源。挑取 3 个黄豆大小的预处理土样置于滤纸的不同位置上, 封口, 30  $^{\circ}$ C 恒温培养,

10 d 后开始持续观察。

## 1.5 粘细菌的纯化与保存

### 1.5.1 菌株的纯化

识别粘细菌, 挑取具有特征性菌落的边缘或子实体的头部于新鲜的 VY/2 培养基上以除去部分较大且不能运动的杂菌<sup>[25]</sup>, 或者用灭菌的牙签刮取长在滤纸上的粘细菌子实体或已被腐蚀的滤纸部分, 将其转入新鲜的铺有灭菌滤纸的 ST21CX 培养基上, 于 30  $^{\circ}$ C 恒温培养观察。

### 1.5.2 菌株的纯度检验及保存

挑取经观察没有杂菌的菌片子实体, 将其接种于 CAS 液体培养基, 30  $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 36 h, 观察 CAS 液体培养基是否出现浑浊。由于粘细菌在营养丰富的培养基内生长缓慢, 而其他杂菌生长则相对较快, 因此 CAS 液体培养基澄清即可认为该菌株已纯。将已经纯化的粘细菌菌株用 30% 灭菌的甘油于 -80  $^{\circ}$ C 长期保存。

## 1.6 粘细菌的鉴定

### 1.6.1 菌种形态的观察

到目前为止, 粘细菌的分类鉴定仍以其形态特征为主要依据, 用 Nikon SMZ745 体视显微镜和 Sony 数码相机对分离纯化出的 VY/2 培养基和 ST21CX 培养基上的粘细菌菌落形态以及子实体结构进行观察并拍照分析。

### 1.6.2 生理生化测定

按照《伯杰细菌鉴定手册》第 8 版中对粘细菌个别属种的生理生化特性的描述, 将纯化的粘细菌菌株进行 LB 液体培养、大肠杆菌利用、刚果红实验、明胶液化、纤维素水解、吐温-80 利用、脲酶利用、硝酸盐还原、淀粉水解、牛奶酪化与抗生素敏感性检测等实验。

### 1.6.3 分子鉴定

采用石英砂及溶菌酶法共同破壁进行染色体 DNA 的提取<sup>[26]</sup>, 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1495R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3') 进行 PCR 扩增<sup>[27]</sup>。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 45 s,

72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 产物送北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序, 利用 NCBI 软件中的 BLAST 对实验菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行同源性比对。

### 1.7 粘细菌的抗菌活性分析

将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌菌液分别接入灭菌的牛肉膏蛋白胨液体培养基内, 37 °C、180 r/min 振荡过夜, 次日将这 3 种菌的液体培养物于 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 取菌体沉淀分别均匀涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 晾干。用经高温高压灭菌的蓝色枪头扎取 VY/2 固体培养基上已纯化的粘细菌菌株, 将其倒扣在涂布有均匀指示细菌的牛肉膏蛋白胨固体培养基上, 并在边缘处放上同样大小的 VY/2 培养基作空白对照, 37 °C 恒温培养, 2 d 后观察抑菌情况。

将马铃薯晚疫病菌事先接入黑麦培养基内培养 3 d, 再将已纯化的菌株琼脂块接于距指示真菌约 1 cm 处, 18 °C 恒温培养, 8 d 后观察抑菌圈的大小。将酿酒酵母菌先接入 YPD 液体培养基内培

养 18 h, 再将其均匀涂布在土豆培养基上, 将已纯化菌株的琼脂块倒扣于该培养基上, 37 °C 恒温培养, 40 h 后观察是否出现抑菌圈。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤参数的测定结果

对内蒙古自治区大兴安岭地区采集的 15 种土壤样品的含水量、pH 值、有机质、有效磷、水解氮以及速效钾的含量进行了测定, 结果如表 3 所示。采集的土壤样品均偏酸, 有机质含量相对较高。其中, 1 号土样的有机质含量最高, 为 27.27 g/kg, 而 12 号土样有机质含量最低, 为 4.02 g/kg。15 个土样的碱解氮含量不均, 1、4、6、7、8 号土样碱解氮含量均相对较高。其中 4 号土样碱解氮含量最高, 为 185.03 mg/kg, 而 12 号土样碱解氮含量最低, 为 24.79 mg/kg, 各土壤样品间存在较大差异。土壤有效磷和速效钾含量分别在 8.08–43.84 mg/kg 和 23.86–178.65 mg/kg 不等。其中 7 号土样有效磷含量最高, 为 43.84 mg/kg, 而 15 号土样有效磷含量最低, 为 8.08 mg/kg, 但其速效钾含量最高, 为 178.65 mg/kg, 而 13 号土样速效钾含量最低, 为 23.86 mg/kg。

表 3 土样参数

Table 3 Parameters of soil samples

样品 Samples	含水量 Water content (%)	pH	有机质 Organic matter (g/kg)	有效磷 Available phosphorus (mg/kg)	水解氮 Hydrolytic nitrogen (mg/kg)	速效钾 Available potassium (mg/kg)
1	32.38±0.02	4.96±0.22	27.27±0.27	21.76±1.08	124.01±1.49	89.89±0.44
2	37.12±0.04	5.39±0.12	8.41±0.12	37.82±0.22	85.89±2.36	128.45±0.36
3	28.52±0.01	5.67±0.12	6.71±0.17	42.89±2.54	85.82±2.37	146.50±0.30
4	50.14±0.01	4.77±0.11	21.93±0.81	19.64±1.96	185.03±1.99	160.93±0.22
5	30.20±0.03	5.78±0.11	8.98±0.50	35.57±1.89	62.97±1.86	94.27±0.45
6	43.48±0.01	5.61±0.18	14.62±0.08	30.96±2.07	125.92±6.32	109.43±0.80
7	30.49±0.01	6.12±0.08	10.46±0.51	43.84±0.31	118.34±1.89	55.91±0.28
8	26.74±0.02	5.78±0.15	18.87±0.46	12.94±1.93	104.93±3.69	175.30±0.44
9	45.96±0.01	5.76±0.25	9.69±0.14	16.21±0.28	61.06±4.21	91.16±0.47
10	50.00±0.03	5.35±0.14	21.37±0.74	9.40±0.43	123.99±3.66	59.50±0.21
11	39.10±0.00	5.69±0.19	15.65±1.37	43.27±0.23	47.70±1.35	64.21±0.18
12	42.53±0.02	5.89±0.17	4.02±0.15	11.69±0.60	24.79±2.30	34.62±0.19
13	40.76±0.01	5.66±0.15	9.42±0.17	12.25±1.78	66.76±1.35	23.86±0.12
14	29.04±0.01	5.56±0.20	6.90±0.19	12.56±0.28	47.70±1.35	51.57±0.19
15	28.13±0.01	6.03±0.16	7.79±0.11	8.08±0.49	89.68±2.40	178.65±0.25

## 2.2 土样中粘细菌群落的 DGGE 分析

对 15 个土样中孢囊杆菌亚目、侏囊菌亚目和堆囊菌亚目的粘细菌基因进行 DGGE 分析, 从 DGGE 图谱中可以看出基因条带数较多(图 1), 分布较为均匀, 大多数泳道的优势条带相同。其中, 粘细菌孢囊杆菌亚目和侏囊菌亚目 16S rRNA 基因的 DGGE 图谱显示 1 号样品和 15 号样品条带最少, 为 21 条, 3 号样品的条带数最多, 为 35 条。粘细菌堆囊菌亚目 16S rRNA 基因的 DGGE 图谱显示 1 号样品条带最少, 为 21 条; 8 号样品的条带数最多, 为 31 条。香农指数越大, 多样性越高。从表 4 中可看出这些采自大兴安岭的土样均表现出较丰富的粘细菌多样性, 香农指数在 2.929–3.406 之间。其中 1 号样品孢囊杆菌亚目和侏囊菌亚目的香农指数最低, 为 2.962; 3 号样品香农指数最高, 为 3.406。5 号样品中堆囊菌亚目的香农指数最低, 为 2.929; 8 号样品香农指数最高, 为 3.269。均匀度指数越接近 1, 群落结构组成越均匀, 研究中 15 个样品中孢囊杆菌亚目、侏囊菌亚目和堆囊菌亚目的粘细菌都具有较高的均

匀度指数, 在 0.934–0.989 之间, 表明土壤样品的群落结构稳定。

在 DGGE 图谱中, 各样品显示出有限数量的优势条带和大部分较弱的条带(图 1)。在 15 个土样中, 大部分条带是共有的, 只有少部分条带较为特殊。如图 1A 孢囊杆菌亚目和侏囊菌亚目中, 4、10、11、14、15 号条带在每个样品中均有出现, 而出现 5 号和 7 号条带的样品数较少, 且分别在 11 号与 12 号样品中较强, 但是在 7 号样品, 即唯一的人工林地土样中则出现了 3 条特异性带 1、2、3。在图 1B 堆囊菌亚目中, 2、4、20 和 23 号条带在每个样品中均有出现, 而 7 号条带较特异, 只出现在 3 号样品中。根据所得到的 16S rRNA 基因指纹图谱, 把其中相对优势的条带以及特别的条带进行切胶回收。因为一部分条带在进行胶回收时的 DNA 量较少, 导致 PCR 扩增没有产物, 出现这样的结果可能是由于从 DGGE 胶上切下的条带为假阳性条带或者是非特异性扩增所致。此外, 部分送去测序的样品由于没有达到测序要求, 出现套峰现象, 导致测序失败, 因此最终只得到了 29 个条带的测序结果。

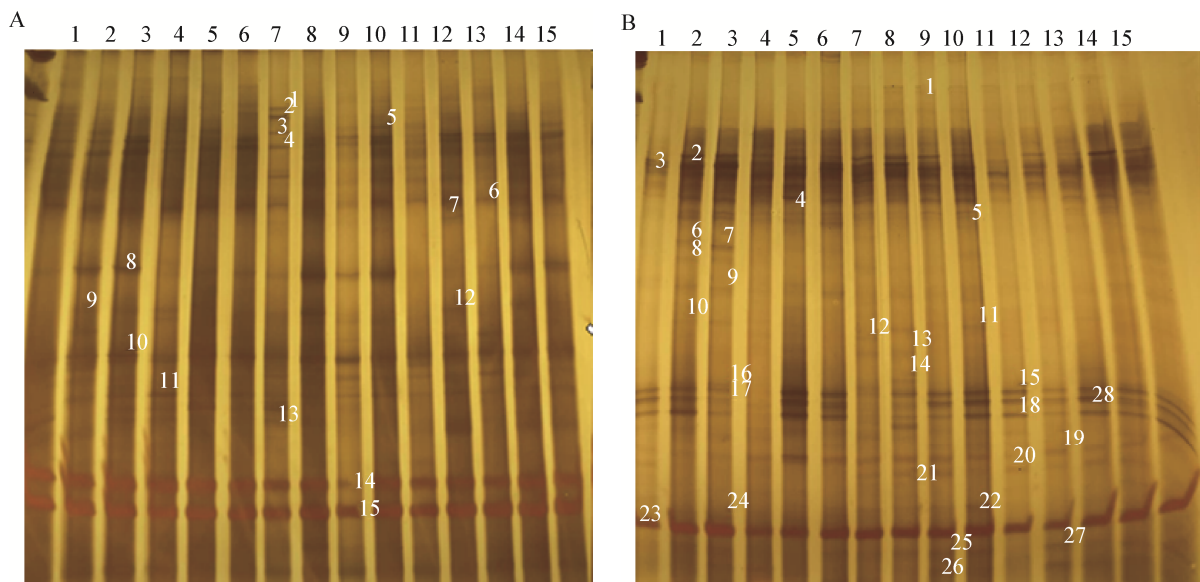


图 1 土样中粘细菌的 DGGE 图谱

Figure 1 DGGE fingerprint of myxobacteria of different soil samples

注: A: 侏囊菌亚目和孢囊杆菌目; B: 堆囊杆菌亚目.

Note: A: Nannocystinea and Cystobacterineae; B: Sorangineae.

表 4 土壤中粘细菌丰富度、多样性及均匀度分析

Table 4 Richness (R), Shannon-Weiner index (H') and Evenness (E) of mycobacteria of different soil samples

样品 Samples	A: Nannocystinea and Cystobacterineae			B: Sorangineae		
	丰富度 Richness (R)	香农指数 Shannon-Weiner index (H')	均匀度指数 Evenness (E)	丰富度 Richness (R)	香农指数 Shannon-Weiner index (H')	均匀度指数 Evenness (E)
1	21	2.962	0.973	21	2.932	0.963
2	27	3.253	0.987	26	3.150	0.967
3	35	3.406	0.958	24	3.143	0.989
4	28	3.119	0.936	24	3.038	0.956
5	23	3.082	0.983	23	2.929	0.934
6	24	3.067	0.965	22	3.000	0.967
7	26	3.089	0.948	25	3.080	0.957
8	22	3.051	0.987	31	3.269	0.952
9	26	3.164	0.971	26	3.186	0.978
10	28	3.269	0.981	26	3.163	0.971
11	28	3.170	0.951	25	3.158	0.981
12	25	3.006	0.934	24	3.032	0.954
13	22	2.982	0.965	24	3.026	0.952
14	23	3.076	0.981	24	3.111	0.979
15	21	2.989	0.982	23	3.098	0.988

注: A: 侏囊菌亚目和孢囊杆菌目; B: 堆囊杆菌亚目。

Note: A: Nannocystinea and Cystobacterineae; B: Sorangineae.

图 1A 中 7 号人工林地土样中的 3 条特异性带分别属于 *Cystobacter* sp.、Uncultured *Archangium* sp.、*Myxococcus xanthus*, 由此可初步推测出人工林地的土样环境可能比较适合这 3 种粘细菌生存, 而 4、10、11、14、15 号条带分别代表的 *Myxococcus virescens*、*Archangium* sp.、*Myxococcus stipitatus*、*Haliangium tepidum*、Uncultured *Plesiocystis* sp. 在每个样品中均有发现, 说明其生存范围广泛且生存能力较强。图 1B 中 3 号样品中的 7 号特异性条带属于 *Sorangium*, 但却不可培养, 推测实验室条件无法模拟 3 号样品的生态环境, 达不到该菌株生长所需的特殊要求, 4 号条带因胶回收后的 DNA 量没有达到测序要求, 导致测序失败, 而出现在每个样品中的 2、20、23 号条带则分别属于 *Sorangium cellulorum*、*Chondromyces apiculatus*、*Polyangium* sp.。

将测序结果与 GenBank 数据库中相似性最高的

菌株进行比对后, 用软件 MEGA 5.0 建立 Neighbor-Joining 系统进化树, 结果如图 2 所示。由图 2 可知, 经鉴定的种属均分为两个分支, 其中一个分支与不可培养的标准菌株同源性相近, 而另一分支大多与可培养的标准菌株同源性相近。图 2 中 29 个条带的同源菌分别代表了粘细菌孢囊杆菌亚目、侏囊菌亚目和堆囊菌亚目的一部分科属, 分别为 *Archangium*、*Cystobacter*、*Haliangium*、*Nannocystis*、*Plesiocystis*、*Myxococcus*、*Corallocooccus*、*Enhygromyxa*、*Sorangium*、*Polyangium*、*Jahnella*、*Chondromyces*、*Byssovorax* 共 13 个属。从系统进化树中可以看出, 这些土壤中孢囊杆菌亚目、侏囊菌亚目和堆囊菌亚目的粘细菌具有很高的多样性。

将土壤中粘细菌多样性与环境参数作相关性分析, 所得 Pearson 相关系数如表 5 所示。丰富度 A 和含水量呈弱负相关, 香农指数 A 和含水量呈显著性负相关, 丰富度 A 和香农指数 A 与有机质的

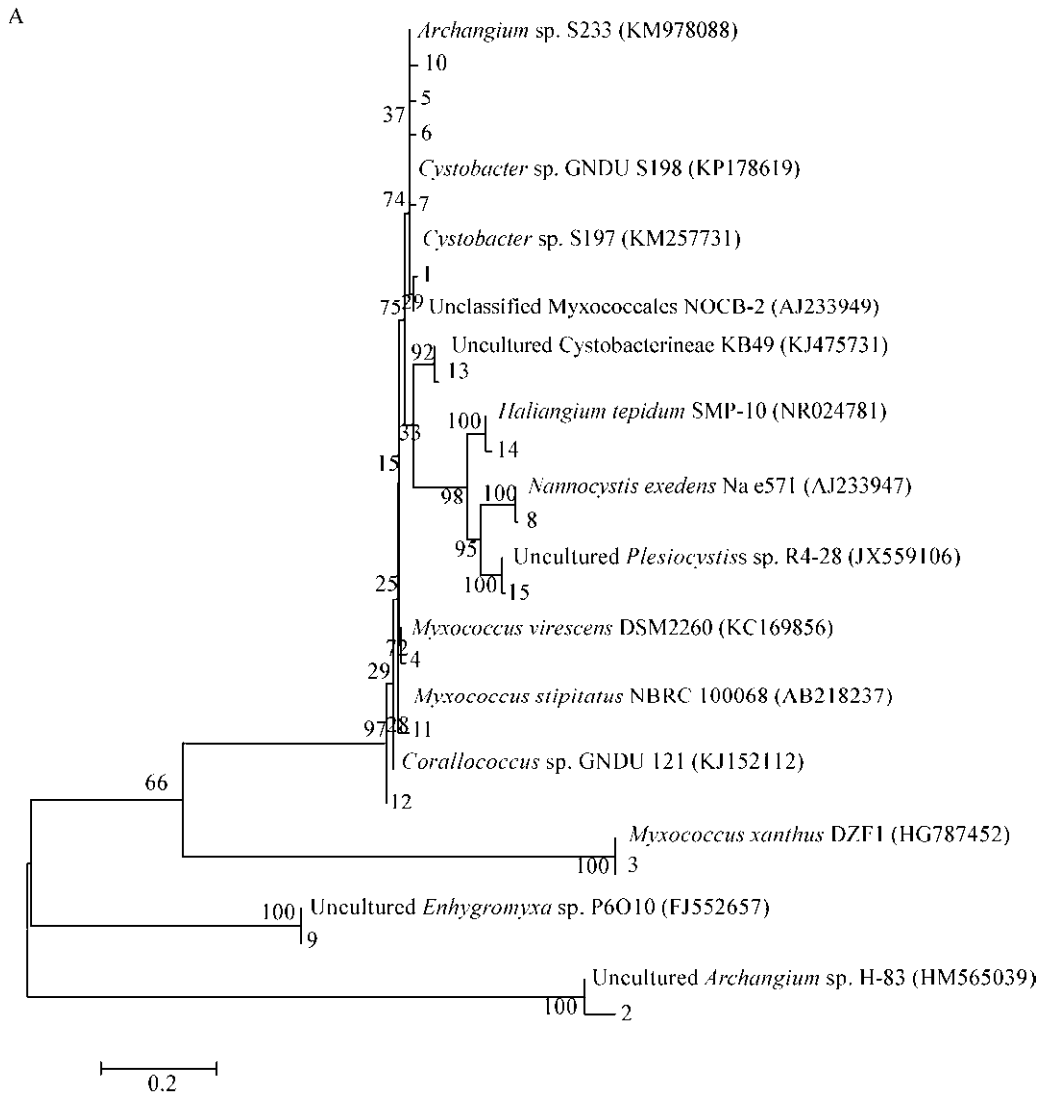


Pearson 相关系数分别为-0.419 和-0.512, 其绝对值均大于 0.4, 因此孢囊杆菌亚目和侏囊菌亚目粘细菌在土壤中的丰富度和香农指数均与有机质含量呈显著性负相关, 另外香农指数 A 与丰富度 A 与有效磷、速效钾均有弱正相关性。除此之外, pH、碱解氮与孢囊杆菌亚目和侏囊菌亚目粘细菌在土壤中的丰富度和香农指数无明显相关性。丰富度 B 与含水量、有效磷呈弱负相关, 与 pH、速效钾呈弱正相关; 香农指数 B 和含水量、有机质、碱解氮呈弱负相关, 与 pH 呈弱正相关。

### 2.3 菌株的分离纯化

利用兔粪诱导、大肠杆菌诱导及滤纸诱导 3 种

分离方法从 15 个土壤样品中共分离出 88 株细菌, 通过直接挑取子实体等纯化方法得到 22 株纯菌。其中, 用兔粪诱导法分离出 37 株菌, 纯菌 14 株; 用大肠杆菌划线诱导法分离出 23 株菌, 纯菌 8 株; 用滤纸诱导法分离出 28 株菌, 暂时还未有纯化的菌株(表 6)。虽然运用滤纸诱导法分离出的菌株数相对较多, 但是由于溶纤维素类群的菌株较难纯化, 一般需要 1-2 年的时间, 因此其纯菌率是最低的; 另外, 由于噬大肠杆菌的微生物种类较多, 所以用大肠杆菌诱导法分离出菌株后, 在纯化的过程中很容易染杂菌, 因此纯化出的粘细菌数量也相对较少。



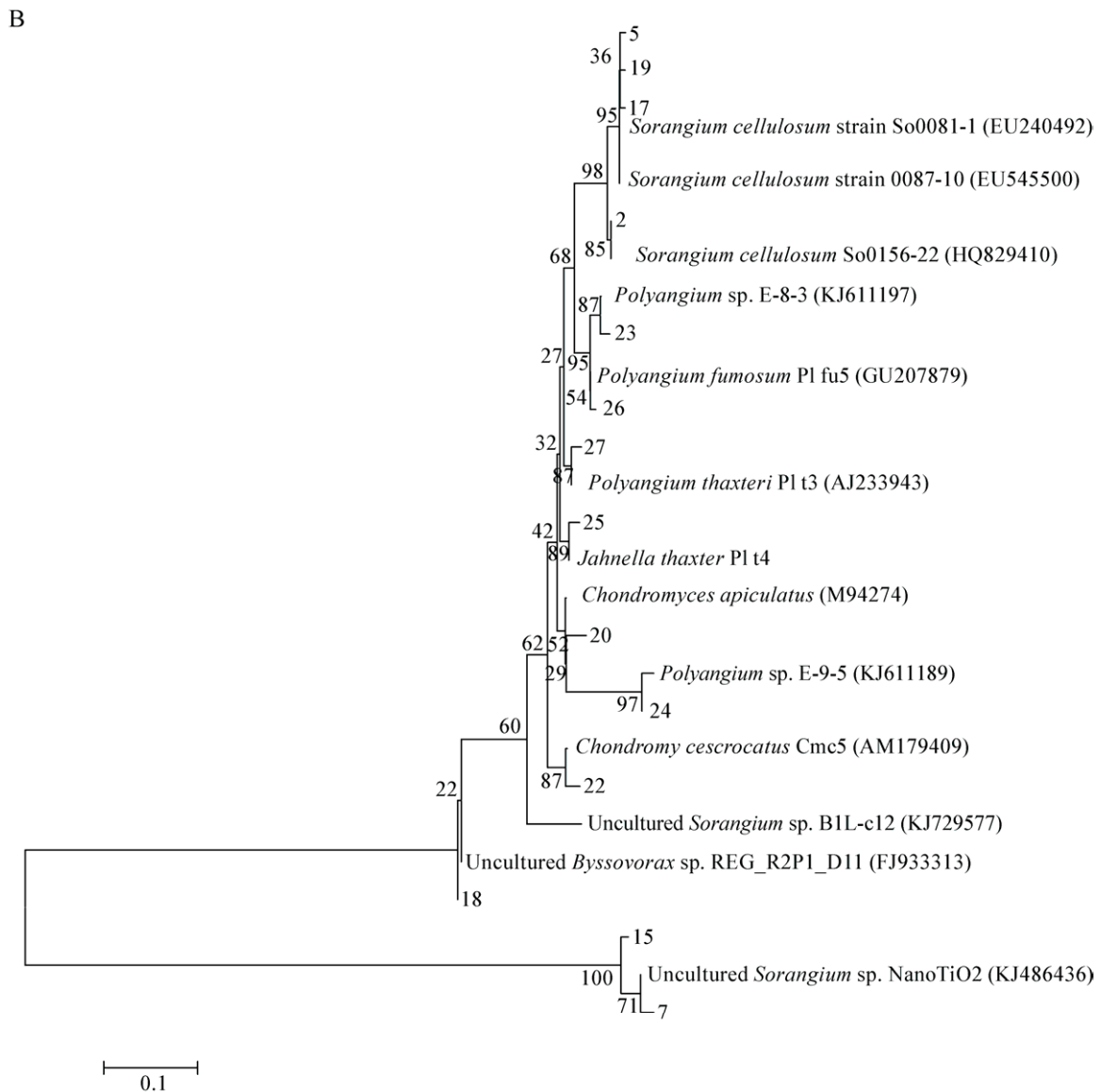


图 2 土样中粘细菌 16S rRNA 基因 DGGE 条带序列系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of DGGE bands of 16S rRNA gene of myxobacteria in soil samples

注: A: 侏囊菌亚目和孢囊杆菌目; B: 堆囊杆菌亚目.

Note: A: Nannocystinea and Cystobacterineae; B: Sorangineae.

## 2.4 菌株的鉴定

### 2.4.1 菌株的形态特征

对分离纯化菌株的子实体形态及菌落进行观察。利用兔粪诱导法分离出的粘细菌数量相对较多且形态各异, 诱导出的部分菌株子实体形态明显, 肉眼可见, 多数呈卵球形, 坚硬程度不同, 颜色鲜亮, 易于分辨。用兔粪诱导法及大肠杆菌

划线诱导法分离出的 22 株纯菌均可以在 VY/2 固体培养基上形成特征性的菌落, 能产生黏液, 能够滑行运动, 可侵噬活菌, 有薄而半透明的膜, 有的圆形扩展, 有的呈放射状波纹。部分菌株的子实体形态如图 3 所示, 经形态特征鉴定可以初步确定纯化出的菌株分属于粘细菌的粘球菌属和珊瑚球菌属。

表 5 土壤中粘细菌多样性与环境参数的 Pearson 相关系数

Table 5 Pearson correlation coefficient between soil parameters and microbial quantity

环境参数 Soil parameters	A: Nannocystinea and Cystobacterineae		B: Sorangineae	
	丰富度	香农指数	丰富度	香农指数
	Richness (R)	Shannon-Weiner index (H')	Richness (R)	Shannon-Weiner index (H')
含水量 Water content	-0.253	-0.423	-0.353	-0.342
pH	0.032	0.081	0.278	0.362
有机质 Organic matter	-0.419	-0.512	-0.122	-0.359
碱解氮 Hydrolytic nitrogen	0.090	-0.117	-0.069	-0.265
有效磷 Available phosphorus	0.279	0.324	-0.225	-0.199
速效钾 Available potassium	0.364	0.279	0.290	0.190

Note:  $|r| < 0.2$  means "very low correlation";  $0.2 \leq |r| < 0.4$  means "low correlation";  $0.4 \leq |r| < 0.7$  means "moderate correlation";  $0.7 \leq |r| < 0.9$  means "high correlation";  $0.9 \leq |r| < 1.0$  means "extremely high correlation".

表 6 3种方法分离纯化的菌株数

Table 6 Number of the strains isolated and purified by three methods

分离方法 Methods of isolation	分离出的菌株数 Number of the isolated strains	纯化出的菌株数 Number of the purified strains	纯菌率 Purification rate of the strains (%)
兔粪诱导法 Rabbit dung pellets inducing method	37	14	37.83
大肠杆菌诱导法 <i>Escherichia coli</i> inducing method	23	8	34.78
滤纸诱导法 Filter paper inducing method	28	0	0.00
合计 Total	88	22	25.00

根据《伯杰细菌鉴定手册》第 8 版,对纯化出的具有粘细菌形态特征的 22 株菌进行形态鉴定,根据菌落和子实体的颜色、形态特征以及能否进行滑行运动,可以将这些菌株分为 7 大类,具体特征如表 7 所示。

#### 2.4.2 菌株的生理生化特征

对纯化的菌株进行生理生化检测,发现所有的菌株均不能在 LB 液体培养基内生长,而且可以利用活的大肠杆菌以及吐温-80,并使明胶液化,可吸附刚果红,但不能降解纤维素,生理生化特征与《伯杰氏细菌手册》中所描述的粘球菌属及珊瑚球菌属的特征相符,结合其形态特征可初步认为纯化的菌株有黄色粘球菌、橙色粘球菌、变绿粘球菌及珊瑚状珊瑚球菌和弱小珊瑚球菌。

#### 2.4.3 菌株的分子鉴定

提取纯化菌株的基因组 DNA,PCR 扩增其 16S rRNA 基因片段并测序,将测序结果通过 BLAST 程序与在 GenBank 数据库中的已知序列进行相似性比对,结果如表 8 所示,所有菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列比对的最高相似性都达到了 97% 以上。

结合形态、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列比对结果,最终确定得到的粘细菌菌株数为 22 株,均属孢囊菌亚目,分属粘球菌属和珊瑚球菌属。其中,4 株为黄色粘球菌,1 株橙色粘球菌,6 株变绿粘球菌,1 株具枝粘球菌,3 株珊瑚粘球菌,3 株大孢珊瑚球菌,3 株弱小珊瑚球菌,1 株珊瑚状珊瑚球菌。

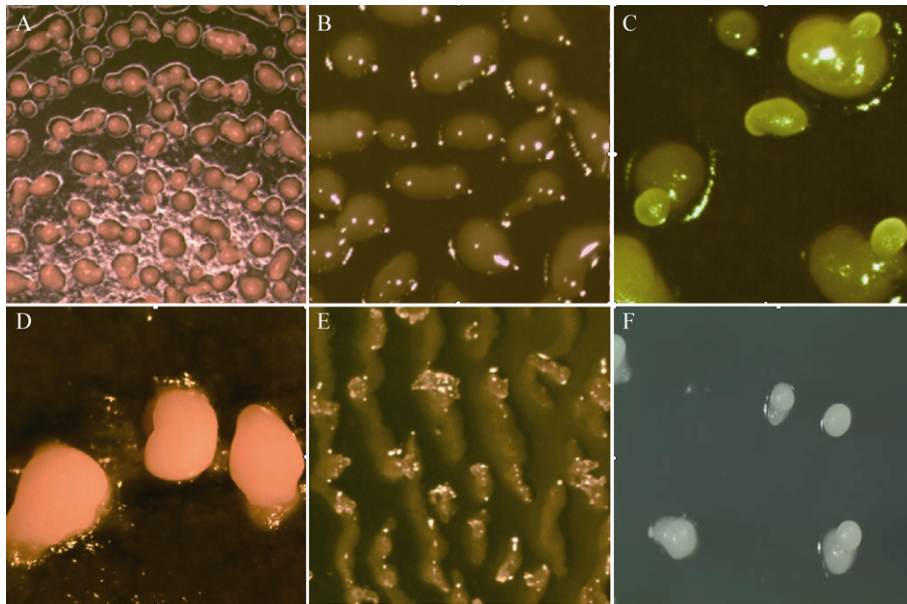


图 3 粘细菌部分纯菌子实体

Figure 3 Fruiting bodies of myxobacteria

注: A、D: 橙色粘球菌; B: 黄色粘球菌; C: 变绿粘球菌; E: 弱小珊瑚球菌; F: 具枝粘球菌。

Note: A, D: *Myxococcus fulvus*; B: *Myxococcus xanthus*; C: *Myxococcus virescens*; E: *Coralloccoccus exiguus*; F: *Myxococcus stipitatus*.

表 7 粘细菌形态特征的鉴定结果

Table 7 Morphological characteristics of the purified strains

菌株类型 Type of the strains	菌株数 Number of the strains	子实体形态 Morphology of fruiting bodies	菌落形态 Colony morphology
A	4	卵球形, 柔软, 基部收缩, 黄色	黄色薄膜状扩展, 半透明, 较亮
B	1	近球形, 柔软, 基部紧缩, 橙黄色	放射状薄膜, 圆形扩展
C	6	椭球形, 较坚硬, 肉粉色	薄膜状扩展, 有辐射波纹
D	1	球形, 基部紧缩, 黄色, 有柄	薄膜状扩展, 呈树根状
E	4	乳白色, 椭球形, 较粘	不规则的山状堆积物, 较硬
F	3	橘色, 有柄, 单个分布	透明, 呈珊瑚状凸起
G	3	不规则龟裂状, 较粘	薄膜状扩展, 菌落不规则

表 8 菌株 16S rRNA 基因序列相似性分析

Table 8 Similarity analysis of 16S rRNA gene sequences of the purified strains

种属 Species	菌株数 Number of the strains	相似性 Similarity (%)
<i>Myxococcus xanthus</i>	4	98-100
<i>Myxococcus fulvus</i>	1	99
<i>Myxococcus virescens</i>	6	98-99
<i>Myxococcus stipitatus</i>	1	99
<i>Myxococcus coralloides</i>	3	98-100
<i>Coralloccoccus macrosporus</i>	3	98-99
<i>Coralloccoccus exiguus</i>	3	98-99
<i>Coralloccoccus coralloide</i>	1	99

为确定所纯化得到的菌株之间的亲缘关系, 选取 8 株不同种间具有代表性的菌株, 并且下载相似性最高的菌株序列, 用 ClustalX 和 MEGA 软件进行多重比对和建立 Neighbor-Joining 系统发育树, 进而阐明种属间的亲缘关系, 结果如图 4 所示。大多数的粘细菌在系统进化树上能形成各自独立的分支, 说明粘细菌形态分类和 16S rRNA 基因的系统发育关系具有较好的一致性。

### 2.5 粘细菌的抗菌活性分析

将得到的 22 株纯菌进行抗菌活性的检测, 观察其抑菌活性以及记录抑菌圈的大小(距离目的菌株 1 mm 内指示菌不生长即视为目的菌株对指示菌

具有抑制活性)。部分菌株抑菌活性的检测结果如图 5 所示。

结果表明, 所得到的 22 株粘细菌均表现出可以对一种甚至多种指示菌产生抗性, 其中有 19 株可以杀死和溶解大肠杆菌 (*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ), 7 株表现出拮抗枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 生长的活性, 13 株对酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的生长表现出抑制作用, 8 株可以抑制金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的生长, 14 株表现出能够抑制马铃薯晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 生长的活性, 结果如表 9 所示。

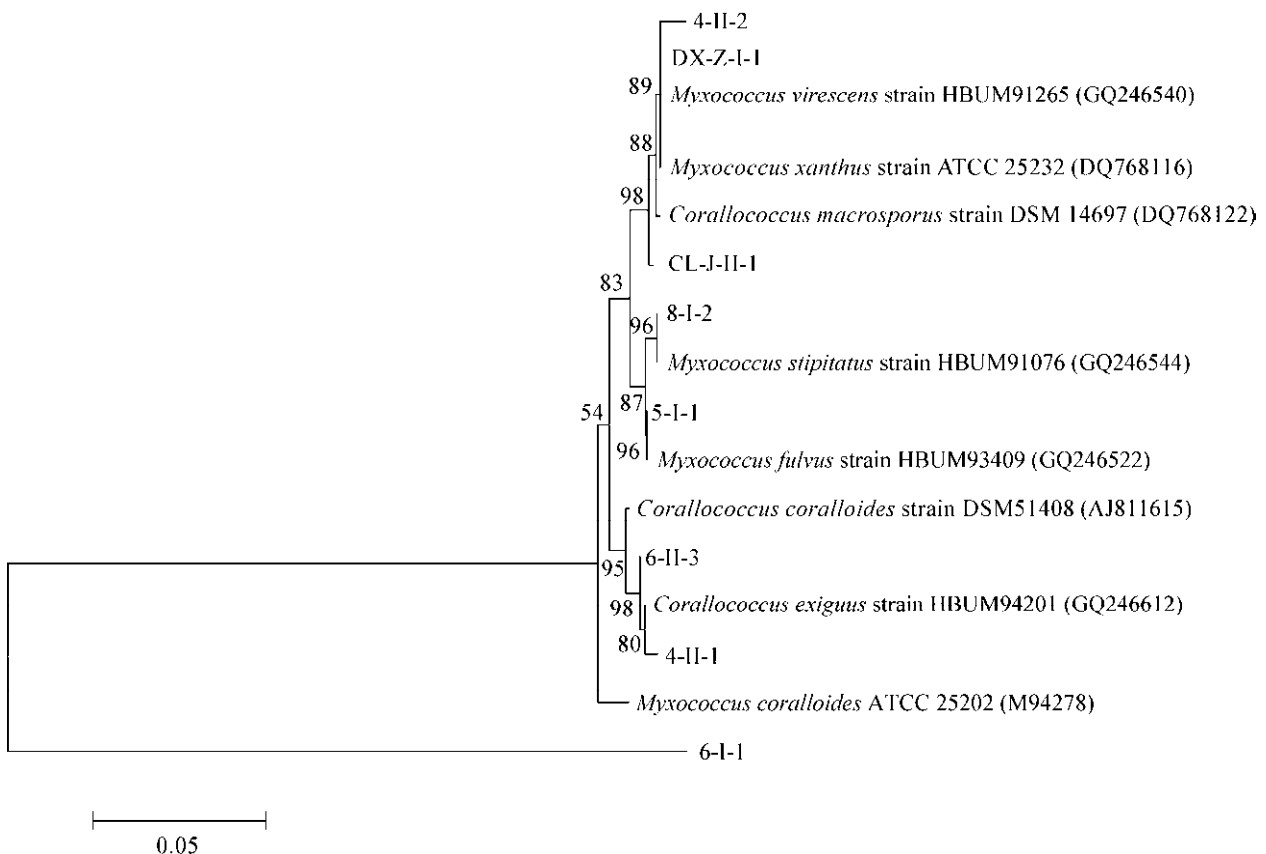


图 4 基于 16S rRNA 基因构建的粘细菌系统进化树分析

Figure 4 Phylogenetic tree of the myxobacteria based on 16S rRNA gene sequences

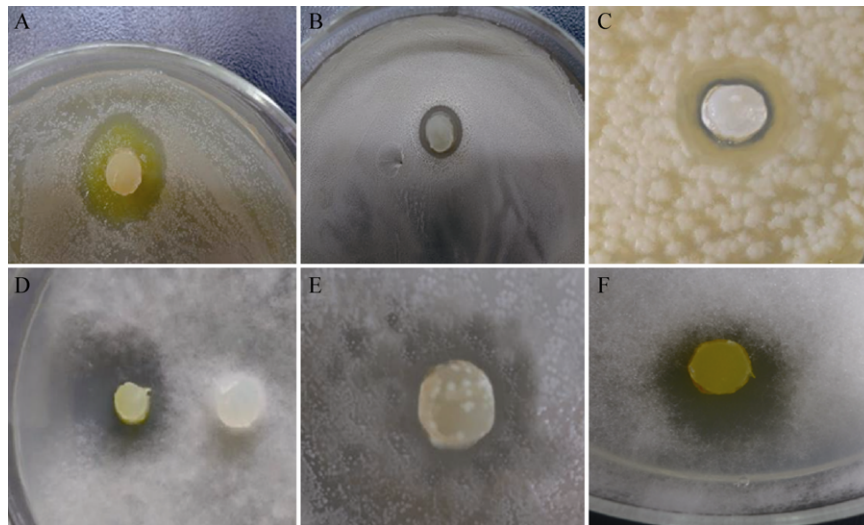


图 5 粘细菌的抗菌活性分析

Figure 5 Antimicrobial activity analysis of Myxobacteria

注: A: 抗大肠杆菌; B: 抗枯草芽孢杆菌; C: 抗金黄色葡萄球菌; D、F: 抗马铃薯晚疫病菌; E: 抗酿酒酵母菌。

Note: A: Against *E. coli*; B: Against *Bacillus subtilis*; C: Against *Staphylococcus aureus*; D, F: Against *Phytophthora infestans*; E: Against *Saccharomyces cerevisiae*.

表 9 粘细菌菌株的抗菌谱

Table 9 Antimicrobial spectrum of the myxobacterial strains

菌种 Species	抗大肠杆菌 菌株数 Number of the strains against <i>E. coli</i>	抗枯草芽孢杆 菌菌株数 Number of the strains against <i>Bacillus subtilis</i>	抗金黄色葡萄 球菌菌株数 Number of the strains against <i>Staphylococcus aureus</i>	抗酿酒酵母菌株数 Number of the strains against <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	抗马铃薯晚疫病菌 菌株数 Number of the strains against <i>Phytophthora infestans</i>
	<i>Myxococcus xanthus</i>	4	1	1	4
<i>Myxococcus fulvus</i>	0	0	1	0	1
<i>Myxococcus virescens</i>	4	1	1	3	1
<i>Myxococcus stipitatus</i>	1	1	1	1	1
<i>Myxococcus coralloides</i>	3	1	1	2	2
<i>Coralloccoccus macrosporus</i>	3	2	1	0	2
<i>Coralloccoccus exiguus</i>	3	1	1	2	2
<i>Coralloccoccus coralloide</i>	1	0	1	1	1
Total	19	7	8	13	14

### 3 讨论与结论

粘细菌分布广泛, 从南极到热带, 从水体到陆地。通常一匙土壤可能产生 5-10 种粘细菌。但是, 不同生境中粘细菌的生态分布仍然未知。关于粘细菌多样性的研究主要是基于传统的分离方法, 目前仍然没有一种高效的粘细菌分离方法, 因此不可避免地低估了粘细菌的多样性。粘细菌的分

离技术通常是将自然样品接种到固体培养基上以期诱导子实体的形成。然而, 许多粘细菌种属在目前的培养条件下并不能形成子实体, 导致大部分菌株丢失。不同环境中的微生物群落通常使用分子生物学技术进行研究。虽然 Wu 等<sup>[24]</sup>利用杂交方法发现粘细菌占不到总细菌的 1%, 但其数量和种类在复杂的群落中仍然未知。本文采用一种快

速、经济的 DGGE 技术研究复杂微生物群落中粘细菌的多样性,通过对粘细菌 16S rRNA 基因的扩增及 DGGE 分析,发现土壤样品中粘细菌的种类较多。从对粘细菌多样性进行分析时所切胶回收条带的测序结果可看出,该土壤样品中含有孢囊杆菌亚目、侏囊菌亚目以及堆囊菌亚目粘细菌共 13 个属,基本覆盖了大部分已知的科属。其中, *Myxococcus virescens*、*Archangium* sp.、*Myxococcus stipitatus*、*Haliangium tepidum*、Uncultured *Plesiocystis* sp.、*Sorangium cellulorum*、*Chondromyces apiculatus*、*Polyangium* sp.共 8 个种的菌株在每个样品中都存在,而 *Cystobacter* sp.、Uncultured *Archangium* sp.、*Myxococcus xanthus* 只出现在 7 号人工林地土样中,3 号渐伐林地土样中出现的特异条带经鉴定属于 *Sorangium*,在目前的实验条件下还不可富集培养。我们的研究结果表明土样中依然存在很多在目前实验条件下不可培养的粘细菌,并且粘细菌的数量远超过 Dawid 的研究,他对 64 个国家采集的 1 398 份土样进行分析时发现每个样品中含有 1-10 种粘细菌<sup>[12]</sup>。Li 等<sup>[28]</sup>基于 Taxon-Specific Gene 利用 Semi-Nested PCR-DGGE 技术对从新疆采集的 8 份土壤进行分析时只发现了 5 个种属的粘细菌,远少于本研究中发现的种属,但其却发现了本实验中未有的 *Stigmatella* 和 *Anaeromyxobacter*,这可能是由于本实验中的土样均属于表层土,因而没有厌氧粘细菌 *Anaeromyxobacter* 的存在,其次 PCR 时所用的引物也有所不同而且不同地区的土壤样品中本就所含的粘细菌多样性不同。此外,山东大学 Wu 等<sup>[24]</sup>和周秀文<sup>[29]</sup>分别用分子杂交和高通量测序技术对校园土壤中粘细菌多样性进行分析,其结果均表明土样中粘细菌种类较多,基本覆盖了已知的科属以及大量未分类粘细菌。这与本研究所得结论基本一致。因此我们推测新的粘细菌资源可能需要依赖于新的分离方法。

本研究对内蒙古自治区大兴安岭地区采集的 15 种土壤样品的含水量、pH 值、有机质、有效磷、水解氮以及速效钾的含量进行了测定。结果发现采集的土壤样品均偏酸,并将 15 个样品的参数分别与全国第二次土壤普查各项土壤养分指标的等级范围分级标准进行对比,可知有机质、有效磷、水解氮以及速效钾的含量整体都处在一个适宜以上的水平。将各参数与 DGGE 分析结果做相关性分析,发现土壤有机质含量是影响孢囊杆菌亚目和侏囊菌亚目粘细菌多样性的主要因素,但没有明显的相关性,可能是由于 DGGE 实验技术本身的分离鉴定能力有限,不能反映所有的种属分布,或者是由于本研究中有部分条带没有得到测序结果,无法鉴定种属。周秀文<sup>[29]</sup>发现粘细菌的丰度与温度、pH、有机碳含量、碳氮比的相关性较低,与降水量以及颗粒分级更是无相关性。内蒙古大兴安岭地区地域辽阔,土壤类型众多,导致产生粘细菌多样性差异的原因众多,除本文中研究的环境因子对粘细菌多样性产生影响外,重金属、盐度、降雨量、地形以及土壤利用方式等诸多因素都可能影响粘细菌的多样性。

本研究利用传统方法分离到的可培养粘细菌只有两个属——粘球菌属和珊瑚球菌,远少于 DGGE 技术发现的粘细菌。由于粘细菌生长缓慢、纯化困难且分离纯化的方法特殊,并不能通过一两次操作达到目的,纯培养一株粘细菌菌株通常需要两三个月,甚至更长时间。此外,部分种属粘细菌在当前的实验条件下并不能富集培养,加之粘细菌子实体结构容易退化和丢失,致使传统的粘细菌分离纯化方法容易遗漏粘细菌菌株,因此,分离到的可培养粘细菌可能只是代表了自然环境中粘细菌类群的一小部分,并不能准确地反映自然环境中粘细菌的真实组成。虽然经过反复实验研究出了一套可行的粘细菌分离纯化方法,但在纯化方法上仍然存在不足,尤其是对溶纤维素类群的粘细菌的纯化方法上,还有待于进一步提高和优化,以提高纯化粘细



菌的效率和缩短纯化时间。另外, 3种分离粘细菌的方法中滤纸诱导法是最难诱导出粘细菌的, 而兔粪诱导法和大肠杆菌诱导法则相对较容易, 这可能是由于嗜细菌性粘细菌种类较多, 而嗜纤维素粘细菌则相对较少, 因此需要创新出更好的方法来分离嗜纤维素粘细菌。

采样地处于内蒙古海拉尔市根河市, 在内蒙古大兴安岭森林生态系统国家野外科学观测研究站试验区内, 大兴安岭中山地带为寒温带半湿润气候区。由于地形、气候、水热条件、植被及土壤等自然环境的不同, 以至大兴安岭地区的生物具有多样性。本研究从该地区采集的土壤样品中均分离得到了粘球菌属及珊瑚球菌属的粘细菌, 说明这两个属粘细菌的生态分布比较广泛。虽然分离到的粘细菌种类大致是相同的, 但由此可以推断出粘球菌属及珊瑚球菌属可能为该地区粘细菌菌群中的优势菌。此外, 在有机质、水解氮、有效磷以及速效钾含量都相对较低的12号土样中也分离到粘细菌, 说明粘细菌在恶劣环境下也具有较弱的生存能力。曾有科学家在南极地区采集到的土样中发现有粘细菌, 这些粘细菌在实验室条件下并不能生存。在阿尔卑斯山脉6-8℃的环境中人类第一次发现了粘球菌属(*Myxococcus*)和小囊菌属(*Nannocystis*)<sup>[30]</sup>, 还有研究发现在美国亚利桑那州的高温沙漠土中也有粘细菌的踪迹<sup>[31]</sup>。这些研究发现在极端环境中也有粘细菌的存在, 说明其生存能力较强, 与本研究的结果相符。

经抗菌活性分析发现, 本课题所有纯化出的粘细菌菌株都有对抗一种或多种指示细菌或真菌的能力, 而且从不同土壤样品中分离出的同一属种的粘细菌菌株所抑制的细菌种类以及抑制强弱均不同。金黄色葡萄球菌是人类化脓感染中最常见的病原菌, 隶属于葡萄球菌属, 有“嗜肉菌”的别称, 可引起局部化脓感染, 也可引起心包炎、肺炎、伪膜性肠炎等, 甚至脓毒症、败血症等全身感染。大肠杆菌是与人们日常生活关系非常密切的一类细菌, 学名称作“大肠埃希菌”, 属于肠道杆菌大类中的一种。

在机体免疫力降低、肠道长期缺乏刺激等特殊情况下, 其会移居到肠道以外的地方, 例如胆囊、尿道、膀胱、阑尾等部位, 造成相应部位的感染或全身播散性感染。本文共筛选出8株抑制金黄色葡萄球菌生长的粘细菌, 19株抑制大肠杆菌生长的粘细菌, 为今后防治金黄色葡萄球菌及大肠杆菌引起的疾病提供新的思路。其中还有14株纯菌表现出能够抑制马铃薯晚疫病病菌(*Phytophthora infestans*)生长的活性。由于人口日益增长, 越来越多的农药被用来提高粮食的生产, 但其一般属于高毒, 每年因农药造成的中毒事件时有发生<sup>[32]</sup>。马铃薯是世界四大粮食作物之一, 仅次于小麦、玉米和水稻, 但每年都会因块茎腐烂大量减产。马铃薯晚疫病是由马铃薯晚疫病病菌引起的马铃薯茎叶死亡和块茎腐臭的一种毁灭性病害。因此, 研发高效无害的防治马铃薯晚疫病的农药迫在眉睫。在本研究中, 从大兴安岭地区土壤样品中分离得到的大部分粘细菌菌株表现出抑制马铃薯晚疫病病菌生长的活性, 为研发有效防治马铃薯晚疫病的农药提供了新思路, 但是其活性物质为何种物质以及其拮抗机理、大田应用等多种问题都有待今后进一步分析。本研究可为抗菌活性物质的进一步提取、分离、纯化及鉴定奠定基础, 也可为内蒙古地区粘细菌的深入研究及抗马铃薯晚疫病农药研发提供基础数据, 具有比较实际的指导意义。

## REFERENCES

- [1] Zhang Q. Isolation, identification and activity of myxobacteria[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Normal University, 2005 (in Chinese)  
张琦. 粘细菌的分离、鉴定及活性研究[D]. 上海: 上海师范大学硕士学位论文, 2005
- [2] Li YZ, Li J, Zhou L, et al. Isolation and identification of myxobacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2000, 40(6): 652-656 (in Chinese)  
李越中, 李健, 周璐, 等. 我国粘细菌(Myxobacteria)资源的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 2000, 40(6): 652-656
- [3] Zhu YL. A study on myxobacteria[J]. Xuzhou Institute of Technology, 2005, 20(5): 25-27 (in Chinese)  
朱蕴兰. 粘细菌研究[J]. 徐州工程学院学报, 2005, 20(5): 25-27
- [4] Nan BY, Zusman DR. Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria[J]. Annual Review of Genetics, 2011, 45(1):



- 21-39
- [5] Wang H, Zhang QL. Research progress of myxobacteria metabolites[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2005, 32(4): 246-250 (in Chinese)  
王赫, 张庆林. 粘细菌代谢产物的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2005, 32(4): 246-250
- [6] Tao LX. Isolation and identification of myxobacteria and study on its antibiotic activity[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2012 (in Chinese)  
陶龙鑫. 粘细菌的分离鉴定及活性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2012
- [7] Zhou L, Li YZ, Li J. Multicellular morphogenesis in myxobacteria and its molecular regulation[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1999, 26(6): 544-547 (in Chinese)  
周璐, 李越中, 李健. 粘细菌的多细胞形态发生及其分子调控[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, 26(6): 544-547
- [8] Ren XB, Wu ZH, Cui HC, et al. Isolation and identification of the strain YR-7 against *Phytophthora infestans* and study on its antibiotic substances[J]. Microbiology China, 2016, 43(7): 1513-1523 (in Chinese)  
任兴波, 武志华, 崔海辰, 等. 致病疫霉拮抗菌株 YR-7 的分离鉴定及其活性物质[J]. 微生物学通报, 2016, 43(7): 1513-1523
- [9] Plaza A, Garcia R, Bifulco G, et al. Aetheramides A and B, potent HIV-inhibitory depsipeptides from a myxobacterium of the new genus "*Aetherobacter*"[J]. Organic Letters, 2012, 14(11): 2854-2857
- [10] Okanya PW, Mohr KI, Gerth K, et al. Hyaladione, an S-methyl cyclohexadiene-dione from *Hyalangium minutum*[J]. Journal of Natural Products, 2012, 75(4): 768-770
- [11] Wenzel Silke C, Müller R. Myxobacteria-microbial factories for the production of bioactive secondary metabolites[J]. Molecular Biosystems, 2009, 5(6): 567-574
- [12] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(4): 403-427
- [13] Jiang DM. Phylogenetic diversity of cultured and uncultured myxobacteria in soil and marine sediments[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2008 (in Chinese)  
蒋德明. 土壤及海底沉积物中可培养与未可培养粘细菌系统发育多样性研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2008
- [14] Li XJ. Microbial community dynamics of biological soil crusts in desert induced by addition of cellulose[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2012 (in Chinese)  
李晓军. 外源纤维素诱导对荒漠生物土壤结皮细菌群落结构的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2012
- [15] Jiang HY. Soil microorganism and activities of soil enzyme in *Larix gmelinii* forest of Daxingan Mountains[D]. Hohhot: Doctoral Dissertation of Inner Mongolia Agricultural University, 2010 (in Chinese)  
姜海燕. 大兴安岭兴安落叶松林土壤微生物与土壤酶活性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学博士学位论文, 2010
- [16] Wu ZH. Isolation and identification of myxobacteria from the soil samples in Liangcheng, Inner Mongolia and study on their antibiotic activity[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2014 (in Chinese)  
武志华. 内蒙古凉城地区粘细菌的分离鉴定及活性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2014
- [17] Ye HY, Zhang JC. A measuring method of soil moisture[J]. Journal of West China Forestry Science, 1984(1): 63-66 (in Chinese)  
叶厚源, 张金畅. 介绍一种土壤湿度速测法[J]. 云南林业科技, 1984(1): 63-66
- [18] Zhang JE. Ecology Common Experimental Research Methods and Techniques[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007 (in Chinese)  
章家恩. 生态学常用实验研究方法与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007
- [19] Xing XL, Yue ZH, Chen RG, et al. Determination and precautions of soil available phosphorus[J]. Agriculture of Henan, 2011(2): 48-49 (in Chinese)  
邢晓丽, 岳志宏, 陈瑞鸽, 等. 土壤有效磷测定方法及注意事项[J]. 河南农业, 2011(2): 48-49
- [20] Li YK, Zhang SM, Zhou FD. Determination of soil available potassium by tetraphenylborate nephelometry[J]. Chinese Journal of Soil Science, 1982(10): 39-42 (in Chinese)  
李西开, 张淑民, 周斐德. 四苯硼比浊法测定土壤速效钾[J]. 土壤通报, 1982(10): 39-42
- [21] Li JY. Determination of soil hydrolyzable nitrogen (alkaline hydrolysis diffusion method)[J]. Agriculture Science-Technology and Information, 2010(10): 15 (in Chinese)  
李金彦. 土壤水解性氮的测定(碱解扩散法)[J]. 农业科技与信息, 2010(10): 15
- [22] Ji TW. Comparison on determining the organic matter contents in the soils by different heating methods in the potassium dichromate-volumetric method[J]. Acta Agriculture Zhejiangensis, 2005, 17(5): 311-313 (in Chinese)  
季天委. 重铬酸钾容量法中不同加热方式测定土壤有机质的比较研究[J]. 浙江农业学报, 2005, 17(5): 311-313
- [23] Yeates C, Gillings MR. Rapid purification of DNA from soil for molecular biodiversity analysis[J]. Letters in Applied Microbiology, 1998, 27(1): 49-53
- [24] Wu ZH, Jiang DM, Li P, et al. Exploring the diversity of myxobacteria in a soil niche by myxobacteria-specific primers and probes[J]. Environmental Microbiology, 2005, 7(10): 1602-1610
- [25] Guo WJ, Tao GJ, Tao WY, et al. A Myxobacterium strain *Sorangium cellulosum* AHB125 producing epothilone B and other anticancer substances[J]. Natural Product Research, 2007, 21(14): 1256-1265
- [26] Zhou XL, Shen W, Rao ZM, et al. A rapid method for preparation of fungal chromosome DNA[J]. Microbiology China, 2004, 31(4): 89-92 (in Chinese)  
周小玲, 沈微, 饶志明, 等. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. 微生物学通报, 2004, 31(4): 89-92
- [27] Zhang ZD, Xie YQ, Chu M, et al. Study on isolation and identification of endophytes in yam rhizome[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2010, 47(1): 126-129 (in Chinese)  
张志东, 谢玉清, 楚敏, 等. 山药内生菌的分离及菌种鉴定研究[J]. 新疆农业科学, 2010, 47(1): 126-129
- [28] Li BY, Yao Q, Zhu HH. Approach to analyze the diversity of

- myxobacteria in soil by Semi-Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) based on taxon-specific gene[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e108877
- [29] Zhou XW. Sub-population census for Myxobacteria in soil and molecular strategy research for their territoriality[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2013 (in Chinese) 周秀文. 土壤中粘细菌群落的调查及领地性行为的分子机制的研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2013
- [30] Menne B, Rückert G. Myxobakterien (Myxobacterales) in Höhlensedimenten des Hagengebirges (Nördliche Kalkalpen)[J]. Die Höhle Z Karst Hohlenkd, 1988, 39: 120-131
- [31] Reichenbach H. *Nannocystis exedens* gen. nov., spec. nov., a new myxobacterium of the family Sorangiaceae[J]. Archiv für Mikrobiologie, 1970, 70(2): 119-138
- [32] Wang C, Feng LY, Cao Y, et al. An effective methidathion-degrading bacteria strain and its degrading condition optimization with the response surface method[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2016, 22(2): 224-229 (in Chinese) 王川, 冯灵玉, 曹瑜, 等. 一株杀扑磷高效降解菌的分离、鉴定及降解条件的响应面法优化[J]. 应用与环境生物学报, 2016, 22(2): 224-229

### 2018 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-2)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
17	第十届全国微生物资源学术暨国家微生物资源共享服务平台运行服务研讨会	中国微生物学会微生物资源专业委员会	7月17-21日	500	新疆阿拉尔	张利莉
18	第11届海洋生物技术与创新药学术学术会议	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	7月	300	浙江舟山	王梁华 13386271017
19	《中国微生物学会第七届全国农业微生物研究及产业化研讨会》暨《第十六届全国杀虫微生物学术研讨会》	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	7月	200	重庆	夏玉先 yuxianxia@cqu.edu.cn
20	类鼻疽学组学术沙龙	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	8月	20	海南三亚	陈海
21	全国医学病毒会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	8月	1000	吉林长春	吴莹
22	工业企业微生物安全控制技术与实践研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	8月	150	北京	010-53218310
23	地质微生物动力学模拟培训	中国微生物学会地质微生物学专业委员会	9月1-15日	20	北京	侯卫国 18210227195
24	第三届真菌感染与宿主免疫学术研讨会	中国微生物学会真菌学专业委员会	9月	300	江苏无锡	卫凤莲 18019481480
25	第九届中国临床微生物学大会青年论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9月	200	吉林吉林	曾雯琪 0574-87035856
26	第九届中国临床微生物学大会暨《医学参考报》微生物学与免疫学论坛	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	9月	500	吉林吉林	曾雯琪 0574-87035856
27	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会与中国畜牧兽医学学会生物制品学学术分会联合学术论坛	中国微生物学会兽医微生物学专业委员会	9月25日	400	未定	丁家波 010-62103674
28	噬菌体理论与应用研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	9月	200	辽宁大连	徐永平 13940930111
29	2018年中国微生物学会学术年会	中国微生物学会	10月19-23日	800	江西南昌	杨海花, 王旭 010-64807200
30	第十三届全国土壤微生物学术讨论会暨第六届全国微生物肥料生产技术研究研讨会	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	10月	350	上海	马鸣超, 姜昕 010-82108702
31	2018工业生物过程控制研讨会	中国微生物学会生化过程模型化与控制专业委员会	10月	200	浙江杭州	夏建业 13761030390