

新疆喀纳斯湖区、一号冰川耐低温细菌 多样性研究初报

房世杰, 常 玮, 王 炜, 茆 军, 顾美英, 朱 静

(新疆农科院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘 要:对采自新疆喀纳斯湖区和一号冰川土样中的耐低温细菌多样性进行了初步研究。以在 10℃ 以下可以正常生长的菌株为筛选对象, 对分离出的菌株进行形态观察, 并结合 16S rDNA 测序结果, 初步鉴定其归属。结果表明, 从喀纳斯湖区分离出耐低温细菌共 66 株, 8 属; 一号冰川分离出耐低温细菌共 38 株, 6 属。从多样性指数来看, 喀纳斯湖区耐低温细菌的物种丰富度高于一号冰川, 但分布不均匀。结合两地细菌组成及系统发育树来看, *Bacillus* 属在两地都属于优势类群, 而一号冰川 *Pseudomonas* 属的种类较丰富, 初步表明至少存在 7 个不同种。

关键词:喀纳斯湖区; 一号冰川; 耐低温细菌; 多样性

中图分类号: S182

文献标识码: A

文章编号: 1001 - 4330(2009)01 - 0059 - 04

Preliminary Studies on Diversity of Psychrotolerant Bacteria in Kanas Lake Spot and No. 1 Glacier in Xinjiang

FANG Shi - jie, CHANG Wei, WANG Wei, MAO Jun, GU Mei - yin, ZHU Jing

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

Abstract: To determine the microbial diversity in soil samples from spot of Kanas Lake and glacier No. 1 in Xinjiang, *Psychrotolerant bacteria* were isolated from soil at 10℃ using 16S rDNA as molecular taxonomy mean. The results showed that there were 66 strains, 8 genres in Kanas Lake spot and 38 strains, 6 genres in glacier No. 1. The indexes of diversity indicated that the Kanas Lake had higher richness than glacier No. 1.

Key words: Kanas Lake spot; glacier No. 1; *Psychrotolerant bacteria*; diversity

冷适应微生物是一类生活在低温环境中的极端环境微生物, 广泛存在于雪山、冰川等常年低温的环境, 是低温生态系统的重要成员之一。根据它们对温度的耐受特征可分为两类, 一类是必须生活在低温条件下, 在 0℃ 可生长繁殖, 最适生长温度不超过 15℃, 最高生长温度不超过 20℃ 的嗜冷微生物 (*Psychrophilic Microorganisms*); 另一类是在 0~5℃ 可生长繁殖, 最适生长温度可在 20℃ 以上的耐冷微生物 (*Psychrotolerant Microorganisms*)^[1]。

随着生物技术的迅猛发展, 低温微生物因其在生产、生活中的潜在价值越来越引起人们关注, 并成为一个新的研究热点^[2,3]。新疆地域广阔, 地貌多样, 拥有非常丰富极端环境资源, 包括沙漠、戈壁、盐碱地、雪山、冰川等。对新疆极端环境微生物的研究主要集中在新种的发现上^[4~8], 而对新疆低温环境中可培养微生物多样性方面的研究较少。研究比较喀纳斯湖区和一号冰川两地耐低温细菌生物多样性, 为新疆低温细菌的应用提供一定的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样 品

土样采自新疆喀纳斯湖区自然保护区(海拔 1 400~2 000 m)和一号冰川的山脚、山腰及山顶处(海

收稿日期: 2008 - 05 - 21

基金项目: 国家自然科学基金资源平台建设计划项目“新疆地区特殊环境微生物菌种资源整理、整合”(2005DKA21201 - 12)

作者简介: 房世杰(1982 -), 男, 新疆人, 助理研究员, 研究方向为微生物菌种资源保藏

通讯作者: 王炜(1965 -), 男, 新疆人, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为生物化学、微生物发酵, (E-mail) wangwei0718@126.com

拔 3 500 ~ 4 000 m)。

1.1.2 主要试剂及仪器

酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、尿素、MgSO₄ · 7H₂O、K₂HPO₄、FeSO₄ · 7H₂O、琼脂、葡萄糖 生化培养箱(上海市离心机械研究所)。

1.1.3 培养基

采用完全培养基:蛋白胨 10 g,酵母浸膏 5 g,K₂HPO₄ 3 g,葡萄糖 1 g,琼脂 15 g,去离子水 1 L,pH 7.0 ~ 7.5,121 ,灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离

采用常规分离方法,取约 1 g 土样,放入有玻璃珠的 100 mL 无菌水中,充分振荡,静置 20 min,梯度稀释后涂布于完全培养基平板上,于 4 冰箱培养 3 ~ 7 d,挑取单菌落,用同样方法纯化一次,4 冰箱斜面保存备用。

1.2.2 形态描述

对纯化的细菌重新活化,培养 3 ~ 7 d,对其基本形态进行观察并记录。参考《伯杰氏细菌鉴定手册》(第八版)和《常见细菌鉴定手册》对分离出的细菌初步进行鉴定。

1.2.3 多样性指数

实验采用 Shannon(以 2 为底)、Pielou(均匀度指数)、Simpson 及物种丰富度 S 作为群落多样性参考指数。

1.3 测序

对分离出的细菌进行总 DNA 提取,使用 16S rDNA 通用引物 27F 5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3',1541R 5'-aag gag gtg atc cag ccg ca-3 进行 PCR 扩增。PCR 产物寄至上海奇康生物技术有限公司进行测序。通过 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)对测序结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同采集地耐低温细菌组成

根据细菌形态,并结合 16S 测序结果鉴定细菌的归属。结果表明,从喀纳斯湖区分离出的耐低温细菌为 66 株,8 属,一号冰川的则为 38 株,6 属。表 1

表 1 不同采集地耐低温细菌组成

Table 1 The species composition of Psychroloerant bacteria in different areas

菌类种类(属) Type of bacteria	株数 Number of strain	
	喀纳斯湖区 Kanos lake areas	一号冰川 Glacier No. 1
芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	45	15
假单胞属 <i>Pseudomonas</i>	5	8
不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i>	6	5
节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	4	7
类杆菌属 <i>Paenibacillus</i>	2	2
沙雷瓦菌属 <i>Serratia</i>	2	0
气球菌属 <i>Aerococcus</i>	1	0
嗜麦芽属 <i>Stenotrophomonas</i>	1	0
棍状杆菌属 <i>Clavibacter</i>	0	1

2.2 不同采集地耐低温细菌多样性指数

多样性指数统计结果表明,喀纳斯湖区耐低温细菌的物种丰富度高于一号冰川,而喀纳斯湖区耐低温细菌种类的分布不均匀。表 2

表 2 不同采集地耐低温细菌多样性指数

Table 2 Diversity indexes of Psychrotolerant bacteria in different area

采集地点	以 2 为底的多样性指数	均匀度指数	相遇指数	物种丰富度
Site	Diversity index	Mean	Dominance	Richness
喀纳斯湖区	1. 69	0. 28	0. 54	8
Kanas Lake area				
一号冰川 Glacier No. 1	2. 19	0. 42	0. 74	6

2. 3 进化树分析

根据 16‘ S 测序结果 ,应用 ClustalX1. 83 及 MEGA3. 1 软件并采用 Neighbour - Joining 算法 ,分别绘制喀纳斯湖区和一号冰川代表菌株的进化树。图 1

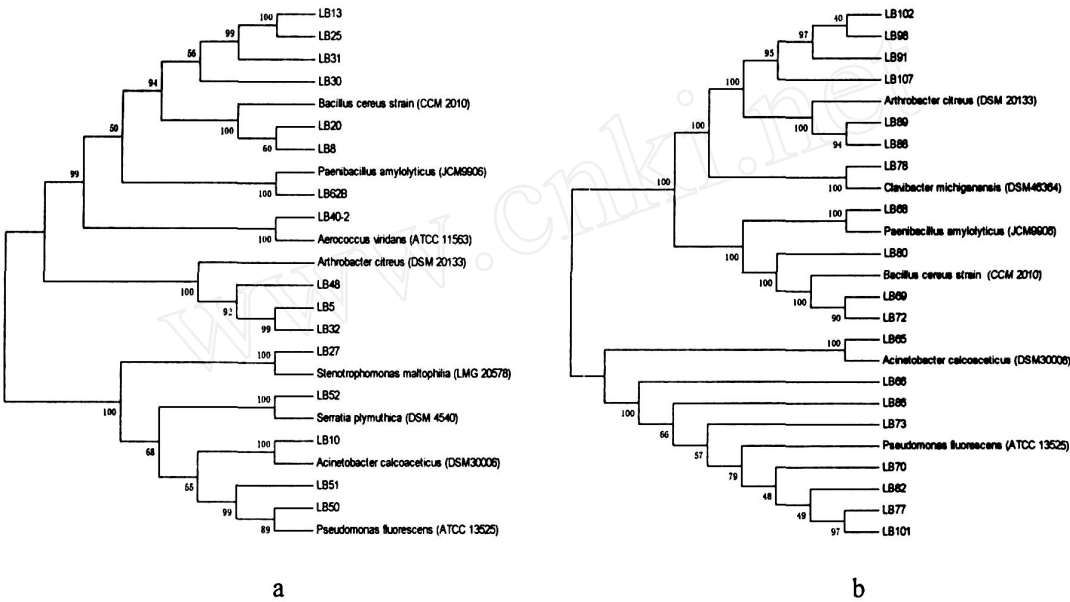


图 1 喀纳斯湖区和一号冰川耐低温细菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic dendrogram of Psychrotolerant bacteria in Kanas lake area (a) and glacier No. 1(b)

3 结论与讨论

3. 1 新疆喀纳斯湖区位于阿尔泰山森林带中部 ,是我国唯一的西伯利亚动植物分布区 ,喀纳斯湖区湖面海拔 1 374 m。一号冰川位于天山山脉天格尔峰北侧 ,海拔 4 479 m ,总长 2. 2 km ,面积 1. 8 km²。两地都存在常年低温环境 ,这为耐低温菌的筛选提供条件。
3. 2 从喀纳斯湖区和一号冰川分离出耐低温细菌分别为 66 株 ,8 属 ;38 株 ,6 属。其中喀纳斯湖区较之一号冰川特有的耐低温细菌有 4 个属 ,分别为 *Serratia*、*Aerococcus*、*Micrococcus* 和 *Stenotrophomonas*。从两地多样性指数来看 ,喀纳斯湖区耐低温细菌的物种丰富度高于一号冰川 ,其 S 值分别为 8 和 6。而喀纳斯湖区耐低温细菌种类的分布较一号冰川不均匀 ,其 Shannon 、Pielou 和 Simpson 指数分别为 1. 72、2. 19 ,0. 28、0. 42 和 0. 54、0. 74。
3. 3 两地获得的细菌类群中包括不动杆菌属、假单孢菌属、沙雷氏菌属、芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、节杆菌属、微球菌属等 ,这一结果与向述荣等^[9]的结论相符。结合两地细菌组成及系统发育树来看 ,*Bacillus* 属在两地都属于优势类群 ,而一号冰川 *Pseudomonas* 属的种类较丰富 ,至少存在 7 个不同种。石鹏君等^[10]对一号冰川不同海拔高度土壤细菌的 DGGE 研究结果显示 ,样品中至少存在 20 个以上的物种。从一号冰川系统发育树来看 ,用一般培养的方法可以得到至少 19 个不同种的耐低温细菌菌株。这说明仍有一部分耐低温细菌种类需要用特殊的培养基或培养条件才能获得。
3. 4 喀纳斯湖区与一号冰川同属常年低温环境 ,而两地耐低温细菌种类上的差别是与两地生境密切相

关的。喀纳斯湖区相较一号冰川海拔较低,其土壤属腐植土,营养丰富,地表植被种类丰富,并且在一年中低温的时间较短、程度较轻,如在夏季;而一号冰川终年低温积雪,土壤营养丰富度低,周边几无植被,因此喀纳斯湖区耐低温细菌的种类更加丰富。而一号冰川高海拔且终年冰雪,这一极端环境增加了自然选择压力,使这里的耐低温细菌的种类较少,但同时细菌群落的分布相对均匀。从多样性指数上也可以看出这一点。

同时,对两地耐低温细菌进行了初步的酶活检测,发现几株菌中存在较高的纤维素酶、果胶酶、脂肪酶及酪蛋白酶活性,其它相关实验还在进行中。

参考文献:

- [1]白玉,杨大群,王建辉,等. 天山冻土耐冷菌的分离与产低温酶菌株的筛选[J]. 冰川冻土. 2005, 27(4): 615 - 618.
- [2]韩晓云,姜安玺,贲岳. 处理低温污水耐冷菌生物膜的研究[J]. 哈尔滨工程大学学报,2007, 28(2): 237 - 240.
- [3]史劲松,许正宏,吴奇凡,等. 冰川环境耐冷菌的冷适蛋白酶分离纯化及酶学性质[J]. 应用与环境生物学报,2006, 12(1): 72 - 75.
- [4]Zhang De - Chao, Wang He - Xiang, Liu Hong - Can, etc.. *Flavobacterium glaciei* sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the China No. 1 glacier[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56: 2 921 - 2 925.
- [5]Zhang De - Chao, Wang He - Xiang, Cui Heng - Lin, etc.. *Cryobacterium psychrotolerans* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium isolated from the China No. 1 glacier[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 866 - 869.
- [6]Cui Heng - Lin, Dilbr Tohty, Liu Hong - Can, etc.. *Natronorubrum sulfidifaciens* sp. nov., an extremely haloalkaliphilic archaeon isolated from Aiding salt lake in Xin - Jiang, China[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 738 - 740.
- [7]Yang Yong, Cui Heng - Lin, Zhou Pei - Jin, etc.. *Haloarcula amylytica* sp. nov., an extremely halophilic archaeon isolated from Aibi salt lake in Xin - Jiang, China[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 103 - 106.
- [8]热衣木·马木提,阿孜古丽·克依木,阿不都拉·阿巴斯. 采自新疆喀纳斯湖区自然保护区茶渍属的中国新记录地衣种[J]. 菌物学报, 2004, 23(1): 167 - 168.
- [9]向述荣,姚檀栋,陈勇,等. 冰川微生物菌群分布的研究概况及前景[J]. 生态学报,2006, 26(9): 3 098 - 3 107.
- [10]石鹏君,孟昆,伍宁丰,等. 新疆一号冰川土壤细菌多样性的研究[J]. 微生物学通报,2006, 33(4): 58 - 63.