

新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌分离鉴定

张鲜姣^{1,2} 黎志坤¹ 谭志远² 郭俊¹ 朱红惠^{1*}

¹广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东华南微生物应用重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 广州 510070

²华南农业大学农学院, 广东省植物分子育种重点实验室, 广州 510642

摘要: 【目的】采用传统的纯培养技术, 分离新疆阿克苏地区典型的盐碱地中的粘细菌, 并初步分析盐碱地土壤中可培养粘细菌资源的多样性。【方法】采用传统的水琼脂法、滤纸法和改良的土壤浸出液法分离新疆阿克苏地区 25 份盐碱地的粘细菌。结合分析土样的酸碱度、含盐量、地理位置及其植被分布情况分析新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌资源多样性。【结果】共分离到 58 株粘细菌, 它们被鉴定为: 粘球菌属 (*Myxococcus*) 33 株; 珊瑚球菌属 (*Coralloccoccus*) 14 株; 孢囊杆菌属 (*Cystobacter*) 6 株; 堆囊菌属 (*Sorangium*) 2 株; 侏囊菌属 (*Nannocystis*) 2 株; 多囊菌属 (*Polyangium*) 1 株。其中粘球菌抗逆性强, 分离的菌株数最多, 在 pH 值 7.5 - 8.5 范围的盐碱地中普遍存在; 其次为珊瑚球菌属; 而侏囊菌属、多囊菌属的菌株较少见。【结论】新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌多样性不高, 可能受分离纯化方法、含盐量以及土壤性质影响较大。

关键词: 粘细菌, 分离, 鉴定, 盐碱地, 多样性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 02-0160-09

粘细菌是原核生物中一类具有复杂多细胞行为的革兰氏阴性细菌^[1], 能够通过细胞间的信号传递和感应, 协同摄食、运动和发育形成子实体^[2]。粘细菌能产生丰富的次级代谢产物, 目前已从粘细菌中筛选、分离到约 600 多种化合物^[3], 是微生物新药开发研究的潜在菌种资源。

粘细菌被认为是土壤微生物, 通常生活于陆生环境中; 常见于树皮、土壤和各种食草动物的粪便; 在干旱、高温及极冷环境下也发现有粘细菌存在。有关粘细菌的分离有许多报道, 如 Dawid^[4] 曾在比利时、德国、美国的沼泽和湿地样品中分离到粘细菌的 10 多个种, 并在南极土样中分析发现了只能在低

温 (4 - 7°C) 下生长的 4 株嗜冷粘细菌。在撒哈拉沙漠土样中曾分离到橙色粘球菌 (*Myxococcus fulvus*)、变绿粘球菌 (*Myxococcus vtrescens*)、珊瑚状珊瑚球菌 (*Coralloccoccus coralloides*)、生锈孢囊杆菌 (*Cystobacter ferrugineus*)、过渡原囊菌 (*Archangium gephyra*) 等粘细菌菌株。日本学者 Iizuka 等^[5-6] 从日本沿海地区的样品中分离到多株耐盐或嗜盐粘细菌, 并发现了粘细菌两个新属 (*Plesiocystis pacifica* 和 *Enhygromyxa salina*)。目前, 欧洲和美洲的粘细菌资源调查研究较为深入, 而我国对粘细菌的研究起步较晚。李越中教授^[7] 采集了我国十几个省市的样品, 分离了大量的粘细菌。张利平等人^[8-9] 对粘

基金项目: 国家自然科学基金 (31170009); 广东省自然科学基金 (10151007002000008); 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开放基金课题重点项目 (BRZD1004)

* 通信作者。Tel: +86-20-87686803; Fax: +86-20-37656628; E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

作者简介: 张鲜姣 (1985 -), 女, 湖南永州人, 硕士, 研究方向为微生物遗传学。E-mail: zhangxianjiao2008@163.com

收稿日期: 2011-08-02; 修回日期: 2011-11-18

细菌的多样性进行了初步探索。但是盐碱地中粘细菌资源迄今报道较少。因此研究盐碱地粘细菌资源的多样性,可促进对粘细菌资源的认识,为微生物新源药物的开发提供新的途径。

阿克苏地区位于新疆天山南麓、塔里木盆地北缘,有山地、平原、沙漠、河流、湖泊等多种地形分布。总耕地面积 524.4 万亩,总灌溉面积 804.9 万亩,其中盐碱地为 188.9 万亩,占总灌溉面积的 23.5%。阿克苏地区气候干旱、少雨、内蒸发量大,加上地形封闭、地表水向盆地输盐量大、骨干排水系统年久失修;导致土壤易溶、盐碱含量高。土壤次生盐渍化严重,并且盐碱化面积广;生态系统遭到严重的破坏,生态平衡失调,对农、牧业可持续发展有着深刻的影响。本研究以阿克苏地区典型的荒漠、山地、河滩、

盐湖、耕地等多种盐碱地土样为研究对象,首次对盐碱地特殊生境下粘细菌资源进行分离研究,并对盐碱地环境的粘细菌多样性进行调查分析,以期发现稀有的粘细菌资源,丰富我国粘细菌菌种资源,也为极端环境的微生物资源研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 采自新疆阿克苏地区典型的盐碱地区域土壤样品 25 份(采集土壤的信息见表 1)。土样取自表层 1 cm - 10 cm 处,有植被覆盖的地方取自植物根际。土样采集后,为防止霉菌污染,立即自然风干,放入 4℃ 冰箱保存。

表 1 25 个土样的物理化学特征

Table 1 The characters of 25 saline-alkaline samples of Xinjiang

Vegetation type	Sampling site	Latitude and longitude of sampling sites	pH	c (Salt hydrology) / (g/kg)
<i>Ligustrum lucidum</i>	农一师一团 (nongyishi-yituan)	E79.9', N40.7'	7.6	7.3
<i>Phragmites australis</i>	农一师十团 (nongyishi-shituan)	E81.3', N40.8'	8.4	31.7
	沙雅盐湖 (shaya saline lake)	E82.8', N41.4'	8.4	67.9
	沙雅滨河路 (shayabinghe load)	E81.9', N41.8'	7.8	70.8
	库车 (kuche)	E83.0', N41.7'	8.1	69.9
	农一师十团 (nongyishishituan)	E81.3', N40.6'	7.6	16.4
<i>Chinese tamarisk</i>	农一师十一团 (nongyishishituan)	E81.6', N40.6'	7.9	130.6
	沙雅二牧场 (shaya er pasture)	E82.2', N40.9'	8.5	25.8
	农一师十团 (nongyishi-shituan)	E81.4', N40.6'	8.1	6.6
<i>Phragmites australis-Chinese tamarisk</i>	阿拉尔电视台 (ala-erTV station)	E81.3', N40.6'	7.9	46.5
	新和 (xinhe)	E82.6', N41.6'	8.3	48.3
	沙雅十三团 (shaya-shisantuan)	E81.7', N41.4'	7.9	199.9
<i>Suaeda giauca</i>	农一师十一团 (nongyishi-shituan)	E81.3', N40.6'	8.5	34.7
<i>Ziziphus zizyphus</i>	沙雅 (shaya)	E81.4', N41.2'	7.9	85.1
Bare alkaline ditch	努尔巴格乡 (nu-erbage)	E82.8', N41.3'	8.6	79.9
	比西巴格乡 (bixibage)	E82.9', N40.6'	8.7	19.7
	博孜墩乡 (bozidun)	E80.6', N41.7'	7.9	76.3
	阿克苏 (akesu)	E80.5', N41.4'	8.6	132.8
	农一师三团 (ningyishi-santuan)	E79.9', N40.9'	8.0	11.7
	阿瓦提 (await)	E80.4', N40.6'	8.1	48.1
	阿克苏 (akesu)	E80.3', N41.3'	8.4	223.8
	农一师八团 (nongyishi-batuan)	E80.8', N40.6'	8.4	346.8
	良繁场 (liangfanchang)	E82.2', N43.5'	7.9	49.0
	乌什县 (wushen)	E79.2', N41.2'	8.0	14.8
	农一师五团 (nongyishi-wutuan)	E80.8', N41.4'	7.9	98.7

1.1.2 主要培养基: 水琼脂培养基^[10], VY/2 培养基^[7], 无机盐培养基^[11], 土壤浸出液培养基(在 ISCX 培养基成分的基础上,用土壤浸出液代替水), CAS 培养基,大肠杆菌培养基(用大肠杆菌代替

VY/2 培养基中的酵母)。

1.1.3 主要试剂和仪器: Tris 饱和酚、dNTPs、CTAB、SDS、EDTA、TaqDNA 聚合酶、琼脂粉、放线菌酮等购于广州威佳公司;引物由上海英俊公司合成;

其他常规分析纯试剂购自环凯公司和广州化学厂等。冷冻离心机 3K30C 德国 SIGMA 公司;PCR 扩增仪 GeneAmp PCRsystem 2400 德国 PE 公司;恒温培养箱 GHP-9160 上海一恒科技公司;超净工作台 SW-CI-1F AIR TECH 公司;凝胶成像系统 BST-20 英国 UVI 公司。

1.2 粘细菌的分离纯化

本文中主要采用兔粪诱导法^[12]、WCX 分离法^[13]、滤纸培养法^[13]对粘细菌进行分离。采用 VY/2 培养基、大肠杆菌培养基反复转接法纯化。将疑似已纯的粘细菌菌株挑入 CAS 液体培养基中,震荡过夜,培养基澄清说明已纯。并用 VY/2 斜面、甘油、直接、冷冻保藏粘细菌。

1.3 粘细菌的分类鉴定

依据《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》^[14]的粘细菌分类标准;用立体解剖镜、光学显微镜、扫描电镜对分离的粘细菌菌落形态、营养细胞、子实体的大小、形态^[14-17]进行观察。根据这些特征对所分离的粘细菌初步归类;并结合 16S rDNA 序列分析,将其鉴定到属。

1.4 总 DNA 的小量提取和 16S rDNA 的 PCR 扩增

采用 CTAB 法抽提粘细菌总 DNA;用细菌通用引物 27F 和 1492R 对粘细菌菌株总 DNA 进行 16S rDNA 扩增^[18-19];PCR 产物送到上海英骏生物公司测序。将所得序列在 EzTaxon(www.eztaxon.org)进行对比,以确定其归属。

2 结果和讨论

2.1 盐碱地粘细菌的分离纯化

本工作采用兔粪诱导法、WCX 分离法、滤纸培

养法以及土壤浸出液法分离纯化了 25 个盐碱地土样的粘细菌,共获得 58 株粘细菌。

粘细菌生长慢,与培养基成分有一定的关联。我们的试验结果显示在不同培养基上粘细菌出现子实体的时间不同。通常大约 2-3 d 左右可见灭菌兔粪上长出子实体结构,大部分子实体为粘球菌,易于纯化。粘细菌在 WCX 大肠杆菌培养基上生长较快 3-5 d 可以镜检观察;而在无机盐滤纸培养基上,生长缓慢,一般要 7-14 d。有些粘细菌的种需要更长时间,如堆囊菌属的一些种。同普通环境中粘细菌的分离纯化一样,盐碱地中分离粘细菌也易被其他革兰氏阴性、阳性菌污染,导致纯化困难。天然兔粪含有机质多,同时也是其他细菌、霉菌生长的良好材料,因此在培养过程中受霉菌污染严重,粘细菌子实体常被霉菌掩盖。

表 2 显示兔粪诱导法只获得 2 株粘球菌,WCX 大肠杆菌划线法、滤纸培养法为分离粘细菌传统方法,在盐碱地土壤中分离到的粘细菌种类、数目比较多。WCX 分离法获得粘细菌 32 株,其中粘球菌属(*Myxococcus*)20 株,珊瑚球菌属(*Corallococcus*)8 株,孢囊杆菌属(*Cystobacter*)3 株,多囊菌属(*Polyangium*)1 株。滤纸培养法分离获得 20 株粘细菌,分别是粘球菌属(*Myxococcus*)8 株,珊瑚球菌属(*Corallococcus*)5 株,孢囊杆菌属(*Cystobacter*)3 株,堆囊菌属(*Sorangium*)2 株,侏囊菌属(*Nannocystis*)2 株。为模拟土壤环境,维持微生物种群间的相互关系,还使用了土壤浸出液作为培养基主要成分,但是此种方法结果不理想,杂菌污染严重,给纯化带来了较大困难;采用该方法仅获得粘细菌 4 株,含粘球菌属(*Myxococcus*)3 株,珊瑚球菌属(*Corallococcus*)1 株。

表 2 各种培养基分离的粘细菌种类和菌株数

Table 2 Myxobacteria strains isolated on different media

Isolation methods	<i>Myxococcus</i>	<i>Corallococcus</i>	<i>Cystobacter</i>	<i>Sorangium</i>	<i>Nannocystis</i>	<i>Polyangium</i>	Total
Isolation by baiting	2						2
WCX agar	20	8	3			1	32
ISCX	8	5	3	2	2		20
Soil extract agar	3	1					4

在分析的 25 个盐碱地土壤样品中,出现频率最高的是粘球菌(*Myxococcus*),几乎在每个土壤样品中都曾分离到。珊瑚球菌属其次,堆囊菌属、侏囊菌属各分离到 2 株,多囊菌属较为少见,

仅发现 1 株;其余各属的粘细菌未曾在盐碱地中发现。

本研究共分离到 58 株粘细菌,根据子实体形态、菌落等特征结合 16S rDNA 序列分析可将其初

步分为：粘球菌属 (*Myxococcus*) 33 株,珊瑚球菌属 (*Corallococcus*) 14 株,孢囊杆菌属 (*Cystobacter*) 6 株,堆囊菌属 (*Sorangium*) 2 株,侏囊菌属 (*Nannocystis*) 2 株,多囊菌属 (*Polyangium*) 1 株。部分粘细菌的子实体及菌落如图 1 所示,表 3 描述了分离的粘细菌各属的主要特征。

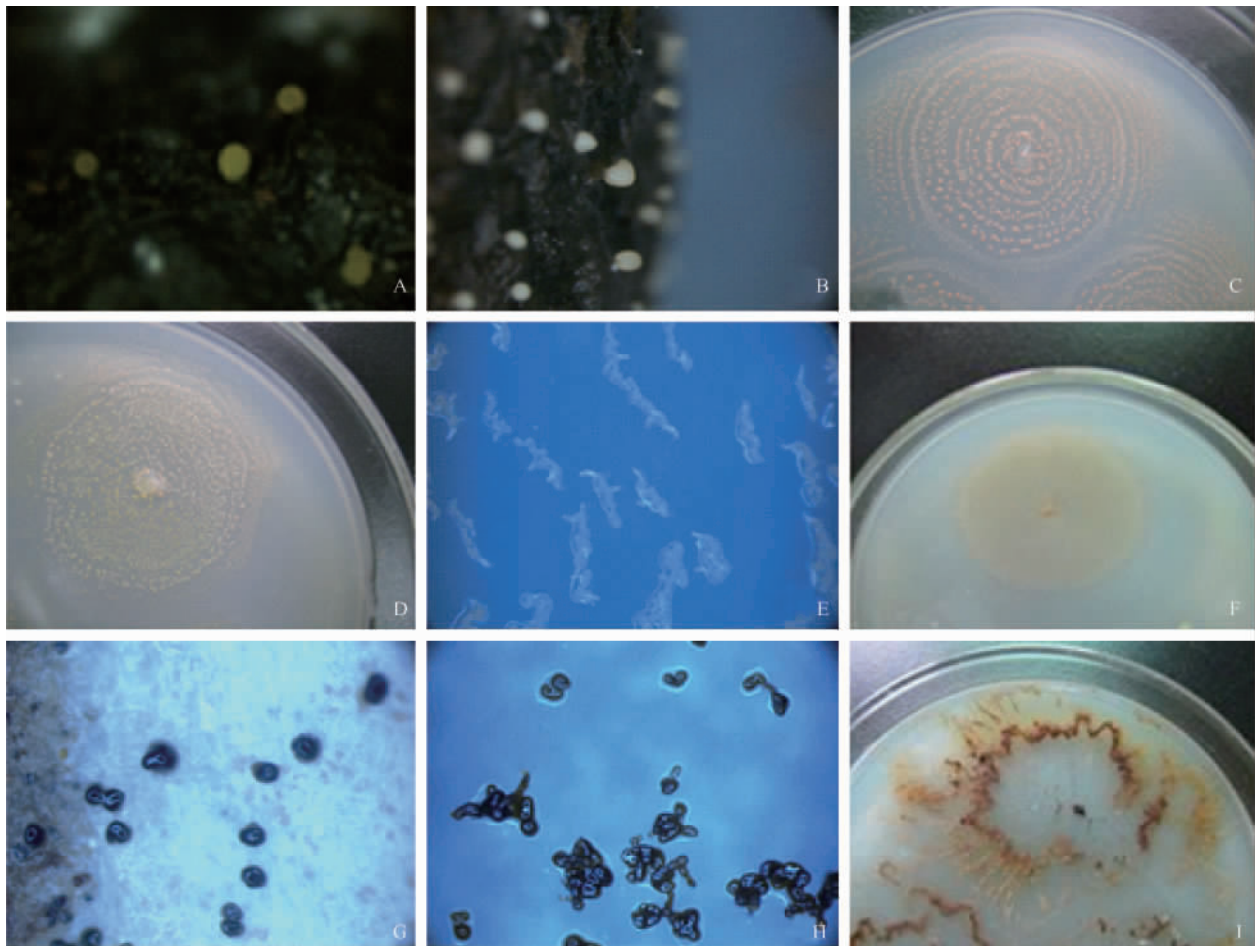


图 1 部分粘细菌子实体及其菌落照片

Fig. 1 Morphological characteristics of some studied Myxobacteria strains. A: 7 \times , *Myxococcus fulvus*; B: 12 \times , *Myxococcus stipitatus*; C: 62 \times , *Myxococcus fulvus*; D: 62 \times , *Myxococcus* sp.; E, F: 7 \times 12 \times , *Corallococcus coralloides*; G: 42 \times , *Nannocystis* sp.; H, I: 9 \times , *Cystobacter* sp. .

表 3 分离到粘细菌各属的主要形态特征

Table 3 Morphological characteristics of the isolated myxobacteria strains

Genera	Fruiting body on nutrition source	Fruiting body on VY/2 media	Vegetative cell	Myxospore	Swarm
<i>Myxococcus</i>	Regular sphere with a heavy capsule, orange, greenish yellow or yellow	spherical yellow, orange, greenish yellow	2 μm - 10 μm long, cigar-shaped	Regular sphere with 1 μm - 2 μm long	Big, yellow, orange or greenish yellow
<i>Cystobacter</i>	Brown, with a hyaline slime matrix	Spherical, brown or apricot-colored	Long, slender rods with needle-shaped 3 μm - 15 μm long	Slender rods with pointed ends, 1 μm - 4 μm	Tough slime sheet and fine radial veins
<i>Corallococcus</i>	Coral-like, orange or brownish	Small, nostalk, orange	Slender with tapering ends, 3 μm - 7 μm	Regular sphere, 1 μm - 2.5 μm long	Easy to break, orange
<i>Nannocystis</i>	Solitary, spherical with small, scattered within the agar	shallow depressions and pits to holes	Short, cylindrical, 2.5 μm - 5 μm long	Ellipsoidal or spherical, were 0.8 μm - 1.2 μm	Etch and corrode the agar to varying degrees
<i>Sorangium</i>	Orange or brown, produced in enormous quantities on digested filter paper	Tiny, often etch of the agar surface	Cylindrical with rounded, were 2 μm - 10 μm	like vegetative cells in shape, 1 μm - 3 μm long	Etch the agar, fruiting bodies arise deep within the agar
<i>Polyangium</i>	Single or cluster	Not form fruiting bodies	cylindrical rods with blunt ends	like vegetative cells in shape	Etch the agar, producing radial tracks

粘细菌的细胞形态通常为细胞较长且末端渐尖,及细胞较粗、短杆状,末端钝圆两类。孢囊杆菌亚目的粘细菌通常营养细胞细长,末端稍尖,大小为 $3.5\ \mu\text{m} - 12\ \mu\text{m}$ 长, $0.6\ \mu\text{m} - 0.8\ \mu\text{m}$ 宽;粘孢子为球形。堆囊菌亚目的营养细胞粗短,末端钝圆,有时几乎为立方形,约 $2.5\ \mu\text{m} - 8\ \mu\text{m}$ 长, $0.6\ \mu\text{m} -$

$1.0\ \mu\text{m}$ 宽。粘孢子与营养细胞在形态上区别很小。侏囊菌亚目的营养细胞粗短,几乎为立方形,营养细胞与堆囊菌亚目的类似,约 $4\ \mu\text{m} - 6\ \mu\text{m}$ 长, $0.6\ \mu\text{m} - 0.7\ \mu\text{m}$ 宽,菌落蚀刻琼脂。图2为分离到的部分粘细菌在电镜下的形态。

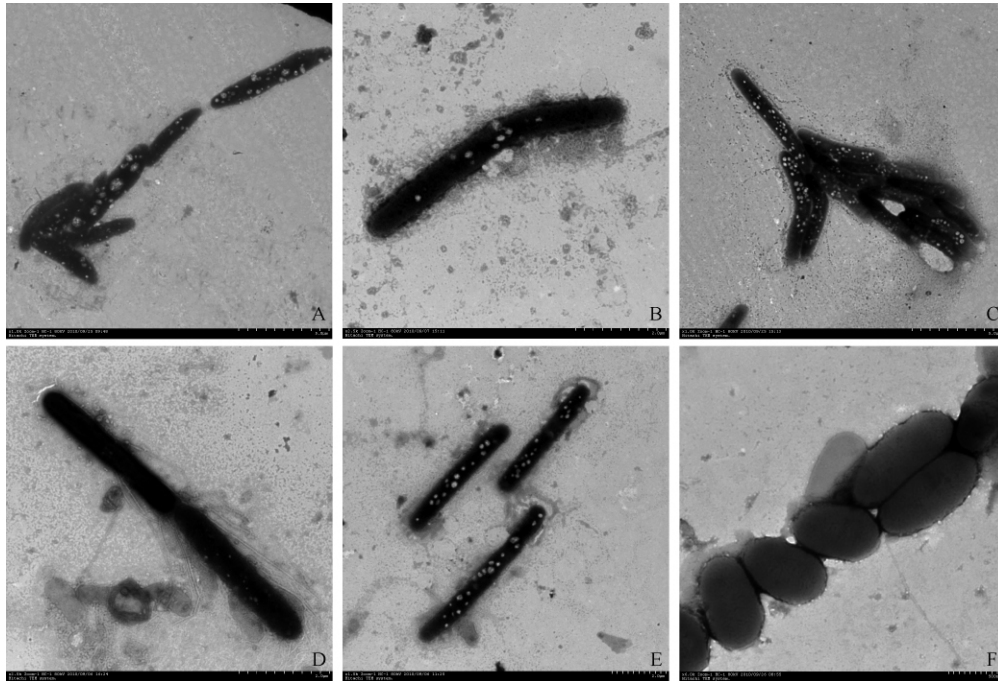


图2 部分粘细菌的透射电镜结果(10000×)

Fig. 2 Electron micrograph of some studied Myxobacteria strains (10000×). A, B: *Corallocooccus*; C, D, E: *Myxococcus*, F: *Nannocystis*.

2.2 盐碱地粘细菌多样性分析

2.2.1 不同 pH 值下粘细菌多样性:粘细菌为全球广布种,广泛存在于各类土壤中,在温暖、半干或干燥的环境大量存在^[20]。它的典型生境是有机质丰富、中性或偏碱性(pH 6-8)环境;包括腐基质丰富的腐木、树皮、食草动物粪便^[21]。但 Brockman^[22]、Dawid^[23]、Hook^[24]和 Singh^[25]曾在 pH 为 3.7、8.0-9.2 的土壤中分离到粘细菌。本试验研究了不同 pH 值样品中粘细菌的分离状况(表 4)。不同 pH 值下分离到的粘细菌数目有较大差异;随着 pH 值增高,分离到的粘细菌数目越少。在 pH 值 7.5-7.8 范围内分离到的粘细菌最多,得到 16 株。其中农一师一团样品中分离到粘球菌属(*Myxococcus*) 5 株,珊瑚球菌属(*Corallocooccus*) 2 株;农一师十团样品中获得(*Myxococcus*) 3 株,珊瑚球菌属(*Corallocooccus*) 3 株,侏囊菌属(*Nannocystis*) 1 株。这两者的 pH 值

都为 7.6,接近于中性环境,分离结果与粘细菌喜生于中性或偏碱性、有机质丰富的环境一致。而在 pH 8.7 的比格巴格乡,仅获得 1 株粘球菌。由此可见,粘细菌比较适合于接近于中性的环境,与以前的研究相符。

而在 pH 8.5 的农一师十一团红枣地样品中共获得 4 株粘细菌,分别为粘球菌属(*Myxococcus*) 1 株,珊瑚球菌属(*Corallocooccus*) 2 株,堆囊菌属(*Sorangium*) 1 株,这可能与人类活动有关。人们通过耕种、浇水、施肥等活动在一定程度上改善了土壤环境,使得土壤环境有机质含量高(分别是 10.02 g/kg)、土壤含盐量低(分别是 34.70 g/kg);有利于微生物生长活动。

2.2.2 含盐量对粘细菌多样性的影响:从新疆阿克苏地区所采的 25 个土样较为贫瘠,但含盐量较高,最高达 346.8 g/kg。本实验研究发现土壤含盐量对粘细菌分布影响较大(表 4)。从含盐量 0-

50 g/kg的样品中分离到粘细菌 36 株,包括了 5 个不同的属;其中粘球菌属 (*Myxococcus*) 19 株,珊瑚球菌属 (*Corallococcus*) 11 株,孢囊杆菌属 (*Cystobacter*) 2 株,堆囊菌属 (*Sorangium*) 2 株,侏囊菌属 (*Nannocystis*) 2 株。低盐(0 - 50 g/kg)环境中粘细菌的多样性丰富,分离到的粘细菌数量、种类也最多。而在高盐范围 150 - 200 g/kg土样中,仅获得粘细菌 3 株,为粘球菌属 (*Myxococcus*) 2 株,珊瑚球菌属 (*Corallococcus*) 1 株。在高盐条件下 (>150 g/kg) 的 3 个样品中,只分离到 7 株

粘细菌,分别是粘球菌属 (*Myxococcus*) 4 株,珊瑚球菌属 (*Corallococcus*) 2 株,多囊菌属 (*Polyangium*) 1 株;主要分布着较为常见的粘球菌属和珊瑚球菌属。粘球菌属 (*Myxococcus*) 的耐盐范围最广,在含盐量 0 - 200 g/kg的样品中都有发现;其次为珊瑚球菌属 (*Corallococcus*) 和孢囊杆菌属 (*Cystobacter*);耐盐能力最差是侏囊菌属 (*Nannocystis*) 和堆囊菌属 (*Sorangium*),在高于 50 g/kg的环境中不能分离到;而多囊菌属 (*Polyangium*) 只有在高盐的环境下分离到,此菌可能是一种嗜盐的粘细菌。

表 4 不同 pH 值、盐度土样中粘细菌分布情况

Table 4 Distribution of myxobacteria in the soil samples with different pH values and salt content

pH	Sample site	c (Salt hydrology) / (g/kg)	<i>Myxococcus</i>	<i>Corallococcus</i>	<i>Cystobacter</i>	<i>Sorangium</i>	<i>Nannocystis</i>	<i>Polyangium</i>	Total
7.6 - 7.8	农一师一团 (nongyishi-yituan)	7.3	5	2					7
	农一师十团 (nongyishi-shituan)	16.4	3	3			1		7
	沙雅滨河路 (shayabinghelu)	70.8	2						2
7.9 - 8.1	沙雅 (shaya)	85.1	1						1
	沙雅十三团 (shiya-shisantuan)	34.7	2	1					3
	良繁场 (liangfanchang)	49.0	1						1
	农一师十一团 (nongyishi-shituan)	130.6	1		2				3
	农一师五团 (nongyishi-wutuan)	98.7	1						1
	阿拉尔电视台 (ala-erTV station)	46.5	1			1			2
	博孜墩乡 (bozidun)	76.3	2						2
	农一师三团 (nongyishisantuan)	11.7	1						1
	乌什县 (wushen)	14.8	1						1
	阿瓦提 (await)	48.1	2				1		2
	库车 (kuche)	69.9	2						2
	农一师十团 (nongyishi-shituan)	6.6	1	3					4
	8.2-8.4	新和 (xinhe)	48.3	1					
沙雅盐湖 (shaya saline lake)		67.9			1				1
阿克苏 (akesu)		223.8	2	1					3
农一师八团 (nongyishi-batuan)		346.8						1	1
农一师十团 (nongyishi-shituan)		31.7	1						1
沙雅二牧场 (shaya er pasture)		25.8		1	2				3
农一师十一团 (nongyishi-shituan)		34.7	1	2		1			4
努尔巴格乡 (nuerbage)		79.9		1	1				2
阿克苏 (akesu)		132.8	1						1
比西巴格乡 (bixibage)		19.7	1						1

2.2.3 不同植被下对粘细菌多样性的影响:本文统计了不同植被环境中粘细菌的分布情况(见表 5)。从毛蜡根际土中分离到的粘细菌数目最多,共分离到粘细菌 7 株,分属于 2 个不同的属;其次为红柳根际土样品,在 3 个样品中分离到 4 个属的 11 株粘细菌;4 个芦苇根际土样品中获得粘细菌 7 株粘细菌,分属于 4 个不同的属;红枣地样品中获得 4 株粘细菌,分属于 3 个不同的属;而在 12 个裸露的盐碱地

样品中共分离得到 20 株粘细菌,粘球菌属 (*Myxococcus*) 14 株,珊瑚球菌属 (*Corallococcus*) 3 株,孢囊杆菌属 (*Cystobacter*) 1 株,侏囊菌属 (*Nannocystis*) 1 株,多囊菌属 (*Polyangium*) 1 株。粘球菌属 (*Myxococcus*) 和珊瑚球菌属 (*Corallococcus*) 对植被的专一性最差,分布在各种环境下;侏囊菌属 (*Nannocystis*) 对植被的专一性较强,只有在红柳 (*Chinese tamarisk*) 环境下和裸露盐碱地中发现;特

别是多囊菌属 (*Polyangium*) 只有在裸露盐碱地中 发现。

表 5 不同植被下粘细菌分布情况

Table 5 Distribution of mycobacteria under different vegetations

Vegetation	Number of samples	Myxococcus	Corallo-coccus	Cystobacter	Sorangium	Nannocystis	Polyangium	Average strain numbers of samples
毛蜡 (<i>Ligustrum lucidum</i>)	1	5	2					7
芦苇 (<i>Phragmites australis</i>)	4	4	1	2				1.8
红柳 (<i>Chinese tamarisk</i>)	3	4	3	3		1		3.6
碱蓬 (<i>Suaeda giauca</i>)	1	2	1					3
芦苇-红柳 (<i>Phragmites australis-Chinese tamarisk</i>)	3	3	3		1			2.3
红枣 (<i>Ziziphus zizyphus</i>)	1	1	2		1			4
裸露盐碱地 (alkaline ditch)	12	14	3	1		1	1	1.7

不同的植被环境中粘细菌差异的原因可能是毛蜡为多年生深根系植物,土壤有机质含量高(32.55 g/kg);而红柳为多年生灌木,根系十分发达,直根深入土中,接地下水,侧根多;耐干旱、适应能力强,这些特点为粘细菌生存提供一定的优越条件。在芦苇根系样品中平均每个样品只分离到 1.8 株粘细菌。可能与芦苇生长环境有关,多生于低湿地或浅水中;而粘细菌多生于干旱、半干旱环境中,因此不利于粘细菌生长,分离的粘细菌相对较少。在红枣地样品中分离到 4 株粘细菌,可能与受人类干预活动有关。

对新疆阿克苏地区典型盐碱地的 25 份土样进行了粘细菌的分离,共获到粘细菌 17 个属中的 6 个属共 58 株菌株。其中粘球菌属 (*Myxococcus*) 33 株,珊瑚球菌属 (*Corallo-coccus*) 14 株,孢囊杆菌属 (*Cystobacter*) 6 株,堆囊菌属 (*Sorangium*) 2 株,侏囊菌属 (*Nannocystis*) 2 株,多囊菌属 (*Polyangium*) 1 株。可见新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌的多样性不高。究其原因有:(1) 盐碱地土壤细菌种类不多。盐碱环境以其独特的理化性质和土壤贫瘠,强烈影响了细菌多样性,其本身所含细菌种类不多;而几乎所有的粘细菌都是食菌性的,因此这样的环境不太利于粘细菌生长。同时由于盐碱地独特的理化性质,在所采的盐碱地土样中即使是采用普通的分离方法,也有不少新种发现。(2) 粘细菌分离纯化的方法是经典的分离法。常用的兔粪诱导法、WCX 分离法、直接加热法、抗生素混合处理法、滤纸培养法等。但是这几种方法具有很大的局限性,只是针对某种或者某类粘细菌,并不是对所有的粘细菌都适用。例如,兔粪诱导法分离到的粘细菌多为橙色粘

球菌 (*Mx. fulvus*)、珊瑚状珊瑚球菌 (*Cc. coralloides*),深褐孢囊杆菌 (*Cystobacter fuscus*),生锈孢囊杆菌 (*Cb. ferrugineus*),过渡原囊菌 (*Ar. gephyra*),直立标桩菌 (*Stigmatella erecta*),变绿粘球菌 (*Mx. utrescens*),黄色粘球菌 (*Myxococcus xanthus*),具盖孢囊杆菌 (*Cystobacter velatus*) 等^[21-26];滤纸片培养法分离出的多为橙色标桩菌 (*Stigmatella aurantiaca*),尖软骨霉状菌 (*Chondromyces apiculatus*),珊瑚状珊瑚球菌 (*Corallo-coccus coralloides*),橙色粘球菌 (*Mx. fulvus*),小脚软骨霉状菌 (*Chondromyces pedicularus*) 以及单囊菌属 (*Haploangium*),软骨霉菌属 (*Chondromyces*),标桩菌属 (*Stigmatella*) 的不同种^[27]。这使得在分离纯化中丢失了很多不同种属的粘细菌。(3) 盐碱地盐度高、土壤贫瘠,不适于粘细菌生长。粘细菌的典型生境是有机质丰富、中性或偏碱性 (pH 6-8) 的环境。有文献报道,盐度高于 1% 的陆生环境下粘细菌不能生长^[14]。本研究采集的 25 个新疆阿克苏地区盐碱地样品的 pH 值在 7.5-8.7 范围,偏碱性;有机质含量低,大约为 5-30 g/kg;而含盐量较高,最高可达 346.8 g/kg;特别是一些盐湖、荒漠地区含盐量极高,不利于粘细菌生长。(4) 土壤性质的不同。粘细菌为土壤常见菌。1 g 土壤中大约有 $2 \times 10^3 - 7.6 \times 10^4$,更有甚者高达 $8 \times 10^4 - 4.5 \times 10^5$ 个粘细菌^[8,28]。通常一勺土样中能分离到 4、5 种粘细菌^[14]。但不同地区、不同样品来源和不同生境中的粘细菌分布是不均匀的^[8]。张利平^[9]在对粘细菌生态多样性的研究中发现:不同土质中,腐殖质类样品粘细菌丰富,褐土和黑土营养丰富,粘细菌含量高;而沙土、风化岩中粘细菌极少。新疆阿克苏地区

所采的盐碱地土样基本上是盐渍化严重的沙性土壤, 不适于粘细菌生长。

参考文献

- [1] Dworkin M. Recent advances in the social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(1): 70-102.
- [2] Kaiser D, Dworkin M. The Myxococcales II // Dworkin M, Kaiser D. Myxobacteria. ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 1993: 257-283.
- [3] Gerth K, Pradella S, Perlova O, Beyer S, Müller R. Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities—past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *Journal of biotechnology*, 2003, 106(2-3): 233-253.
- [4] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000(24): 403-427.
- [5] Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, Hiraishi A, Ahn JW, Yamanaka S. *Plesiocystis pacifica* gen. nov. sp. nov., a marine myxobacterium that contains dihydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coast of Japan. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53(1): 189-195.
- [6] Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, Tokura M, Hiraishi A, Yamanaka S. *Enhygromyxa salina* gen. nov. sp. nov., a slightly halophilic myxobacterium isolated from the coastal areas of Japan. *Systematic and applied Microbiology*, 2003, 26(2): 189-196.
- [7] 李越中, 李健, 周璐, 张勇, 胡玮. 我国粘细菌 (Myxobacteria) 资源的分离与鉴定. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2000, 40(6): 652-656.
- [8] 李艳青, 张利平, 杨润蕾. 河北省粘细菌物种资源多样性的研究—承德市区及其五县生态样品的研究. *河北科技大学学报 (Journal of Hebei University of Science and Technology)*, 2003, 269(3): 215-224.
- [9] 方晓梅, 张利平. 粘细菌生态多样性的初步研究. *生物多样性 (Biodiversity Science)*, 2001, 9(3): 207-213.
- [10] 李越中, 李健. 粘细菌的分离与纯化. *微生物学通报 (Microbiology)*, 1997, 24(4): 37-240.
- [11] 郝光飞, 张利平. 神农架样品中粘细菌的分离与纯化. *安徽农业科学 (Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 2008, 36(14): 5839-5841.
- [12] Reichenbach H. A simple method for the purification of myxobacteria. *Journal of Microbiological methods*, 1983, 2(1): 77-79.
- [13] Cai YZ, Wang B, LI YZ, Xun G, Zhang HQ, Gao PJ. Morphologies and Phylogenetic Classification of Cellulolytic Myxobacteria. *Systematic and applied Microbiology*, 2003, 1(26): 104-109.
- [14] Reichenbach H. The Myxococcales. In: Garrity GM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Part 3: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon-proteobacteria. 2nd ed, New York: Springer-Verlag, 2005, 1059-1143.
- [15] H Reichenbach H, Dworkin M. The myxobacteria. In: Balous A, et al. *The Prokaryotes*. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1992, 3418-3487.
- [16] Shimkets LJ, Dworkin M, Reichenbach H. The myxobacteria. In: Martin Dworkin, et al. *The Prokaryotes*. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2006, 7: 31-115.
- [17] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 4(24): 403-427.
- [18] Brosius JJ, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF. Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 1981, 148(20): 107-127.
- [19] Brunel B, Givaudan A, Lanois A, Akhurst RJ, Boemare N. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA gene. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(2): 574-580.
- [20] Krzemieniewska H, Krzemieniewski S. Die Myxobakterien von Polen. *Acta Societatis Boanicorum Polontae*, 1927, 5, 79-98.
- [21] Singh BN. Distribution of fruiting myxobacteria in Indian soils, bark of trees and dung of herbivorous animals. *Indian Journal of Microbiology*, 1971, 11, 47-92.
- [22] Brockman ER, Boyd WL. Myxobacteria from soils of the Alaskan and Canadian Arctic. *Journal of Bacteriology*, 1963, 86(3): 605-606.
- [23] Dawid W. Fruchtkörper-bildende Myxobakterien in Böden Brasiliens. *Journal of Basic Microbiology*, 1978, 2(18): 83-93.
- [24] Hook LA. Distribution of myxobacters in aquatic habitats in an alkaline bog. *Systematic and applied Microbiology*, 1977, 34(3): 333-335.

- [25] Singh BN. Myxobacteria in soils and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria. *Journal of General Microbiology*, 1947, 1(1): 1-10.
- [26] Dawid W. Vorkommen und Verbreitung Fruchtkörperbildender Myxobakterien im Siebengebirge Vergleichende Untersuchungen unter Berücksichtigung charakteristischer Biotope. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 1979, 10(19): 705-719.
- [27] Nellis LF, Gamer HR. Methods of isolation and purification of *Chondromyces*. *Journal of Bacteriology*, 1964, 87(1): 230-231.
- [28] McCurdy HD. Studies on the taxonomy of the Myxobacteriales. I. Record of Canadian isolates and survey of methods. *Canadian Journal of Microbiology*, 1969, 15(12): 1453-1461.

Isolation and identification of myxobacteria in the saline-alkaline soils of Akesu in Xinjiang

Xianjiao Zhang^{1,2}, Zhikun Li¹, Zhiyuan Tan², Jun Guo¹, Honghui Zhu^{1*}

¹ Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou Provincial Open Laboratory of Microbial New Application Technique, State Key Laboratory of Applied Microbiology (Ministry—Guangdong Province Jointly Breeding Base), Guangzhou 510070, China

² South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, Guangzhou 510462, China

Abstract: [Objective] To isolate myxobacteria and investigate their diversity in saline-alkaline soils from Akesu in Xinjiang. [Methods] Conventional culture-dependent methods, e. g. baiting technique, water agar, soil extract agar and mineral agar, were used to isolate myxobacteria from 25 soil samples collected from Akesu areas of Xinjiang. Combining with physicochemical properties (acidity/alkalinity, salt concentration, vegetation and geographical locations) of the soil samples, myxobacterial diversity was studied. [Results] In total 58 strains were isolated, and identified as belonging to 6 different genera, i. e. *Myxococcus*, *Cystobacter*, *Corallococcus*, *Sorangium*, *Nannocystis* and *Polyangium* of *Myxococcales*. The most frequent genus isolated was *Myxococcus* which may better adapt in harsh environments. Different myxobacterial diversity was detected in different habitat. [Conclusion] Myxobacteria diversity was low in saline-alkaline soils of Akesu in Xinjiang.

Keywords: Myxobacteria, isolation, identification, saline-alkaline soils, diversity

(本文责编:王晋芳)

Support by the National Natural Science Foundation of China (31170009), by the Natural Science Foundation of Guangdong (10151007002000008) and by the Open Foundation of Tarim University (BRZD1004)

* Corresponding author. Tel: +86-20-87676803; Fax: +86-20-37656629; E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

Received: 2 August 2011 / Revised: 18 November 2011