

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(3):334–341; 4 March 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

西藏扎布耶盐湖细菌多样性的免培养技术分析

张现辉^{1,2,3}, 孔凡晶^{1,2,3*}

(¹ 中国地质科学院矿产资源研究所, 北京 100037)

(² 国土资源部盐湖资源与环境重点实验室, 北京 100037)

(³ 中国地质科学院盐湖与热水资源研究发展中心, 北京 100037)

摘要:【目的】利用免培养技术, 获得有关青藏高原高盐度、高海拔盐湖的细菌多样性认识。【方法】从西藏扎布耶盐湖沉积样品中提取微生物总 DNA, 利用细菌引物 f530/r1492 扩增 16S rRNA 基因, 然后构建 16S rRNA 基因质粒文库。采用 *Hae* III 和 *Hha* I 两种内切酶对阳性克隆质粒 DNA 进行 ARDRA 分型分析, 根据分型结果挑选克隆进行测序。得到它们的 16S rRNA 基因部分序列, 根据获得的序列构建构建系统发育树。【结果】在系统发育树上, 部分克隆(占总克隆数的 57.14%)与已知细菌属归于同一分支, 主要分布在 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲、拟杆菌门(Bacteroidetes)、厚壁菌门(Firmicutes)和疣微菌门(Verrucomicrobia)的 23 个嗜盐细菌属之中。其余的克隆为未培养序列, 与前者差异很大, 在进化树上形成了独立的分支。【结论】研究结果显示出扎布耶茶卡湖中的细菌组成具有极其丰富的多样性。

关键词: 扎布耶盐湖, 细菌多样性, 免培养技术; 16S rRNA 基因; ARDRA

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 03-0334-08

盐湖是一种咸化水体, 通常是指湖水盐度不低于 3.5% (w/v) 的湖泊, 也包括表面卤水干涸、由含盐沉积与晶间卤水组成的干盐湖以及地下卤水湖^[1]。大多为内陆湖泊, 可以形成相对封闭的微生物生态系统。湖中微生物主要由真核绿藻、硅藻、原生动物、真菌、蓝细菌、光合细菌、好氧革兰氏阴性有机营养细菌和古菌等组成^[2–3]。嗜盐和耐盐生物在三域中均有分布^[4]。其中的细菌类群是盐湖微生物的重要组成部分, 它们适应了高盐环境, 并参与湖中多种物质的循环与能量的传递过程。因此研究盐湖中细菌的多样性对于完整地理解盐湖生态系统功能、开发利用极端环境微生物资源具有重要的意义。

我国是个多盐湖的国家, 按照时空分布特点可以将全国的盐湖分为 4 个区: 青藏高原盐湖区、西北

部盐湖区、东北部盐湖区和东部分散盐湖区^[5]。我国盐湖主要集中在青藏高原盐湖区和西北部盐湖区。其中尤以青藏高原盐湖区最为独特。扎布耶盐湖地处青藏高原腹地西部, 冈底斯山北侧, 湖面海拔 4421 m, 面积 242 km², 日照辐射 84 万 J/cm² · a, 年均日照率 72.1%, 太阳照度在 145000 Lux 以上, 昼夜温差 29℃, 年均风速 4.1 m/s^[6]。扎布耶盐湖地理位置独特, 具有高海拔、高寒、高盐、富含锂元素等特征。从理论上讲, 独特的生境孕育独特的生物资源。但是由于青藏高原海拔高、高寒、缺氧等恶劣的环境条件导致采样极度困难, 所以对于西藏盐湖中微生物资源的研究鲜见报端。范华鹏^[7]等曾研究过扎布耶盐湖古菌的多样性, 而尚未见到对扎布耶盐湖细菌多样性的相关报道。本文拟就扎布耶盐湖

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40772065; 40572059)

* 通信作者。Tel: +86-10-68999550; Fax: +86-10-68999076; E-mail: kfjbj2002@yahoo.com.cn

作者简介: 张现辉 (1983–), 男, 河南人, 硕士研究生, 主要从事极端环境微生物方面的研究。E-mail: xhman66@126.com

收稿日期: 2009-11-03; 修回日期: 2009-12-25

细菌的多样性问题开展研究,为了解盐湖极端微生物生态功能,开发利用极端微生物资源打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集:样品于2008年9月17日采集自西藏扎布耶茶卡北湖南岸(N31°23', E84°04', 湖面海拔4421米),包括湖边泥样和岸边湖水样品,其中湖水的实时测量盐度为23%(W/V),pH值为9,属于碱性卤水。扎布耶湖水离子组成为:K⁺ 11.2 g/L, Na⁺ 61.3 g/L, SO₄²⁻ 27.5 g/L, Ca²⁺ 小于10 mg/L, Mg²⁺ 14.1 mg/L, P 小于5 mg/L, Br 86.0 mg/L, Cs 5.61 mg/L, Cl⁻ 75.4 g/L, HCO₃⁻ 0, CO₃²⁻ 11.2 g/L, N 2.19 mg/L(国家地质测试中心,北京)。样品采集后,带回实验室,存于-80℃冰箱备用。

1.1.2 主要试剂和仪器:高速冷冻离心机为Beckman Counter公司的64R台式离心机,电泳系统为北京市六一仪器厂的稳压稳流电泳仪DYY—B,凝胶检测及成像为ALPHA Inotech公司的紫外凝胶成像系统;PCR扩增仪为Bio-Rad公司的iCycler。

1.2 样品总DNA的提取

DNA提取流程参考Mouné等^[8]改进而来。具体流程如下:取3 g泥样,加入12 mL 50 mmol/L的磷酸钠缓冲液(pH 8.0),涡旋5 min。6000 × g, 10 min,弃上清回收细胞;沉淀中加入6 mL裂解混合液1(0.15 mol/L NaCl, 0.1 mol/L EDTA, pH8.0),涡旋混匀,加入100 μL 15 mg/mL的溶菌酶,混匀后37℃温浴1 h;加入6 mL混合液2[0.5 mol/L NaCl; 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 10% SDS(w/v)]冰浴10 min,65℃热浴10 min,循环3次;冰上冷却,加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提;6000 × g,离心10 min,4℃;取上清,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),抽提。6000 × g,离心10 min,4℃;取上清,加入等体积的冷异丙醇,-20℃静置1 h;10000 × g,10 min,回收DNA;干燥后加入400 μL的TE缓冲液,存于-20℃备用。所提总DNA用1%(w/v)琼脂糖进行电泳分离,紫外凝胶成像仪进行检测。

1.3 16S rRNA基因的PCR扩增

选用一套引物530F(5'-GTGCCAGCMG CCGCGGTAA-3')和1492R(5'-TACGGYTACCTG TTACGACTT-3'),用来扩增细菌特异性的16S rRNA基因^[9]。PCR反应体系为50 μL,包括

50 μmol/L的引物各1 μL,5 μL 10 × buffer,1 μL 10 mmol/L dNTP,2U Taq DNA聚合酶,模板DNA溶液1 μL,ddH₂O补足50 μL体系。PCR扩增程序如下:95℃预变性1 min,95℃热变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,30个循环,72℃延伸10 min。

1.4 克隆和转化

PCR扩增产物根据琼脂糖回收试剂盒说明书(天根生化,北京)进行纯化回收,回收产物用pGEM-T载体系统(Promega,USA)进行酶联,连接产物转化到*Escherichia coli* DH5α高感受态细胞(天根生化,北京),构建16S rRNA基因文库。将转化产物平铺到含有IPTG、X-gal及氨苄青霉素的平板上过夜培养,筛选阳性克隆。

1.5 核糖体DNA扩增片段限制性内切酶分析(ARDRA)

克隆子接种到含氨苄的液体培养基中,经过夜摇菌培养后,取1.5 mL用质粒小提试剂盒(天根生化,北京)提取质粒DNA。对于阳性克隆,选用TOYOBO的Hae III对含克隆片段的质粒进行酶切,采用10 μL酶切反应体系:内切酶1.5 U, DNA 0.2-1 μg,10 ×缓冲液2 μL,37℃温浴1 h,酶切失活条件为:80℃,20 min,终止反应。

取6 μL进行电泳检测,电泳参数为:2%(w/v)琼脂糖,80 V,40 min。将电泳后的琼脂糖胶在EB溶液中染色15 min,脱色15 min,紫外凝胶成像检测,统计操作分类单元(OTUs)的数量。

对于含有较多克隆片段的OTU1,用Hha I二次酶切,10 μL酶切反应体系如下:10 ×缓冲液,10 × BSA,内切酶2 U,37℃温浴1 h,65℃ 20 min终止反应。电泳检测方法如上所述。

1.6 DNA测序与序列分析

选择不同OTUs的阳性克隆送到上海生工公司进行测序,测序结果用DNAMAN进行序比对后删除序列头部中所含的载体序列,根据测序图谱去除尾部信号杂带,余下700-800 bp序列用作后续分析。提交序列到GenBank中进行序列同源性比对,找到各序列的最佳匹配的16S rRNA序列。分别从NCBI中调出这些相似序列,采用MEGA 4.0软件包中的Kimura 2-Parameter Distance模型进行多序列匹配排列。根据排列结果,删除匹配结果中多余的部分序列后,余下全部比对序列长度都在700 bp左右,用这些序列再次进行多序列比对,根据比对结果用邻接法((Neighbor-joining method)构建系统发育树^[10]。根据所得到的序列分析结果,进一步分析扎

布耶盐湖中的细菌多样性。

1.7 GenBank 数据库登录号 (Accession number)

经 GenBank 上 Vecscreen 在线检测去除克隆载体污染序列后,共向 GenBank 提交 102 个 16S rRNA 基因的部分序列,数据库登录号为 GU130304 – GU130405。

2 结果

2.1 DNA 提取和 PCR 扩增

从扎布耶盐湖沉积样品中,我们成功提取了总 DNA,DNA 条带单一、完整,说明上述方法适合于高盐生境样品中总 DNA 的提取。以总 DNA 为模板,利用细菌引物组合 530F + 1492R,扩增出来了长度约 1 kb 的细菌 16S rRNA 基因片段。

2.2 ARDRA 分型结果

根据蓝白斑筛选的原理,在平板上显示白色的

克隆为插入了 16S rRNA 基因片段的阳性克隆,本研究共分析了 309 个阳性克隆。提取阳性克隆质粒 DNA 进行 ARDA 分析,图 1 为部分质粒 DNA 电泳检测图谱,阳性克隆的质粒 DNA 由于插入了外源片段,要比蓝斑大,在电泳图谱上迁移速度慢。将提取的质粒直接全部采用 *Hae*III 酶切后,进行琼脂糖电泳分析。电泳检测结果如图 2 所示。根据琼脂糖电泳图谱,这些克隆大致可分为 30 个操作分类单元 (OTUs)^[11],利用绘图软件 corelDRAW 12 绘制的模式图电泳图谱模式图如图 3 所示,其中以类型 1 所含克隆最多,共有有 145 个克隆,占总数的 46.93%。由于类型 1 的克隆数过多,因此对这个类型做了进一步的酶切分析,以期得到不同的亚型。图 4 就是用 *Hha* I 对这 145 个克隆进行酶切分析后得到的亚型。分型结果作为后续筛选克隆测序的重要参考。

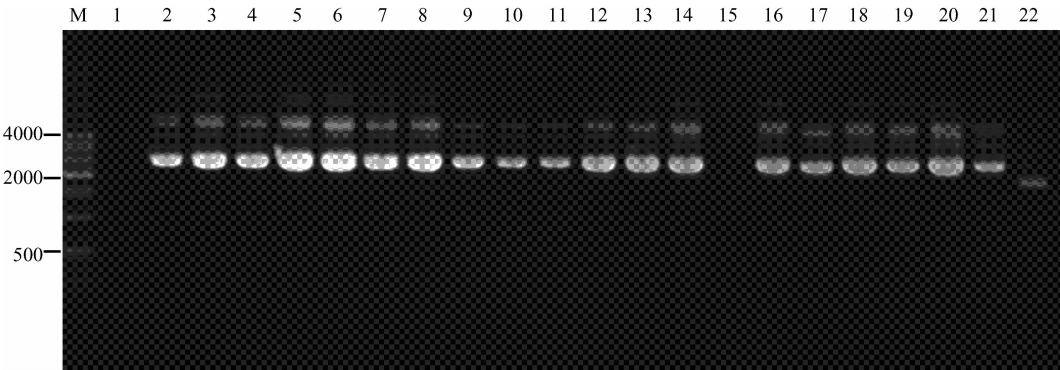


图 1 部分阳性克隆质粒 DNA 电泳检测图谱

Fig.1 Electrophoresis analysis of plasmid DNA of partial positive clones. M: 500 bp ladder marker; 2 – 21: positive clones; 22: negative clone; 1, 15: failed to DNA extraction.

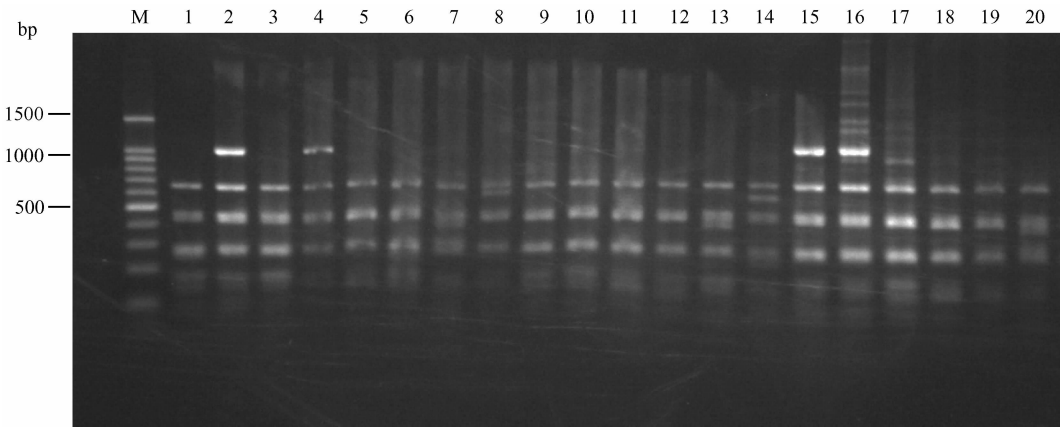


图 2 质粒 DNA 限制性内切酶电泳分析

Fig.2 Electrophoresis analysis of plasmids DNA digested with Restriction enzyme. M: 100bp ladder marker; 1, 3, 5 – 7, 9 – 12, 18 – 20: OTU1; 17: OTU 6; 2, 4, 15, 16: OTU 2; 8: OTU 3; 14: OTU 4; 13: OTU 5.

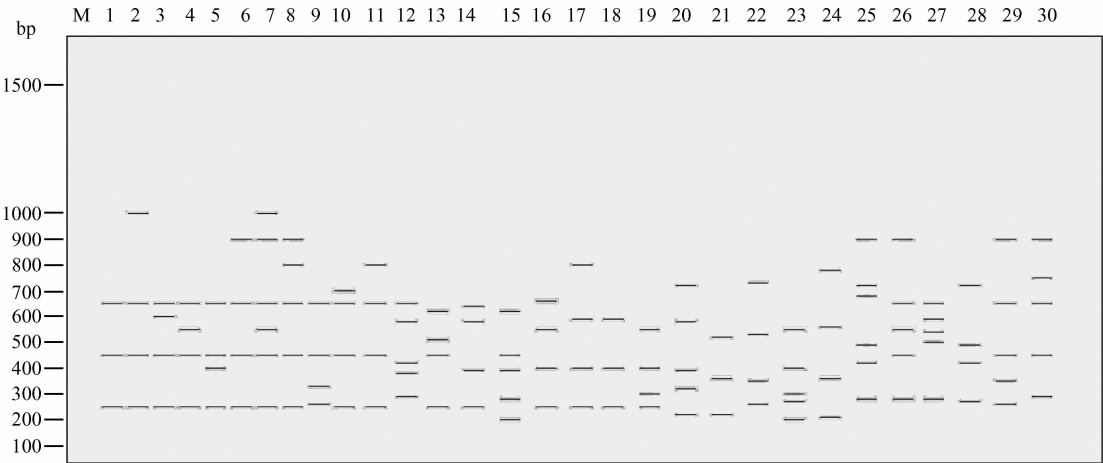


图3 质粒 DNA 的限制性内切酶 *Hae* III 酶切结果示意图

Fig. 3 Schematic patterns of plasmid DNA digested with Restriction enzyme *Hae* III. M: DNA marker; 1 –30; OTU1-OTU30.

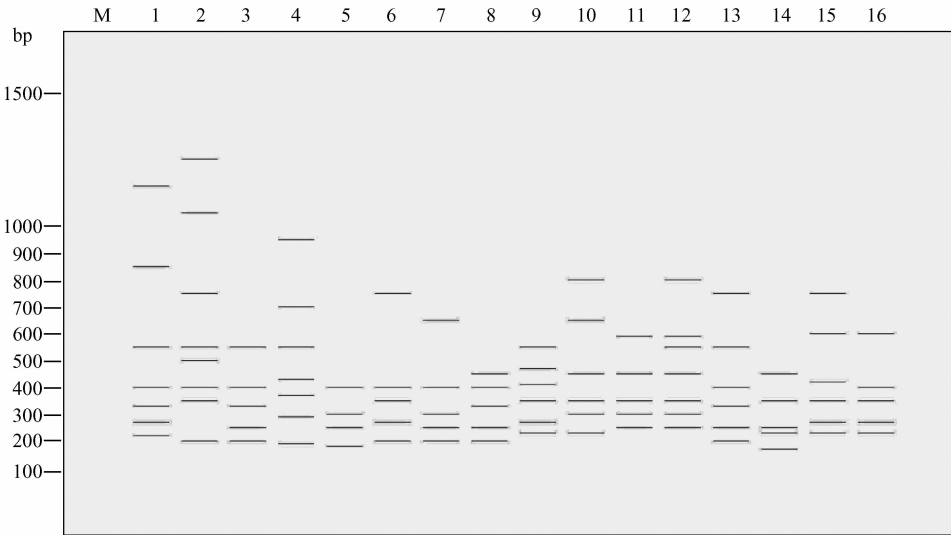


图4 OTU1 质粒 DNA 的限制性内切酶 *Hha* I 酶切结果示意图

Fig. 4 Schematic patterns of plasmids after DNA digested with Restriction enzyme *Hha* I ,1 –16 subtypes of OTU1.

2.3 测序结果分析

根据酶切分型的结果,随机选取各个类型的 5 个克隆进行测序分析,类型中少于 5 个克隆的则全部测序。根据测序结果决定是否需要针对各 OTU 追加测序。共计得到 127 个克隆的测序结果,序列在 GenBank 中进行 Blast 同源性比对,寻找最相似的已知序列以及最接近的具有明确分类地位的序列。根据比对结果可以将 127 个序列分为两类:一类是具有明确分类地位的序列,这部分包含 72 个序列,占总数的 57. 14%,这部分序列的最佳匹配序列都有明确的分类地位;余下 54 个序列均找不到具有明确分类地位的匹配序列,位居前面的最高相似序列都是未培养序列,一时难以确定其分类学地位。

针对具有明确分类地位的序列,根据 Blast 结果,依照相似性的高低,将克隆序列进行分类整理,

Blast 结果完全一致的归类为一组,Blast 结果显示属于一个属的划分到一个大组之中。如克隆 seq. 28、seq. 29、seq. 57、seq. 247 由于 Blast 结果完全一致,被归为一组,再加上克隆 seq. 3、seq. 153、seq. 253、seq. 54 和 seq. 256 则属于同一大类——*Alkalimonas* 属。结果显示,72 个序列分别位于 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲、 δ -变形菌纲、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门和疣微菌门的 21 个嗜盐细菌属之中。其中 *Pseudomonas*、*Alkalimonas* 和 *Nitriicola* 三个属的含量最高,占总克隆数的 28. 35%。已具有明确分类地位的 72 个序列之中,与已知序列同源性相比不高于 97% 的竟有 30 个序列,而且 seq. 93 与 *Fucophilus fucoidanolyticus* 同源性只有 89%。这充分说明扎布耶盐湖中具有很多在分类学上具有潜在意义的备选菌株。

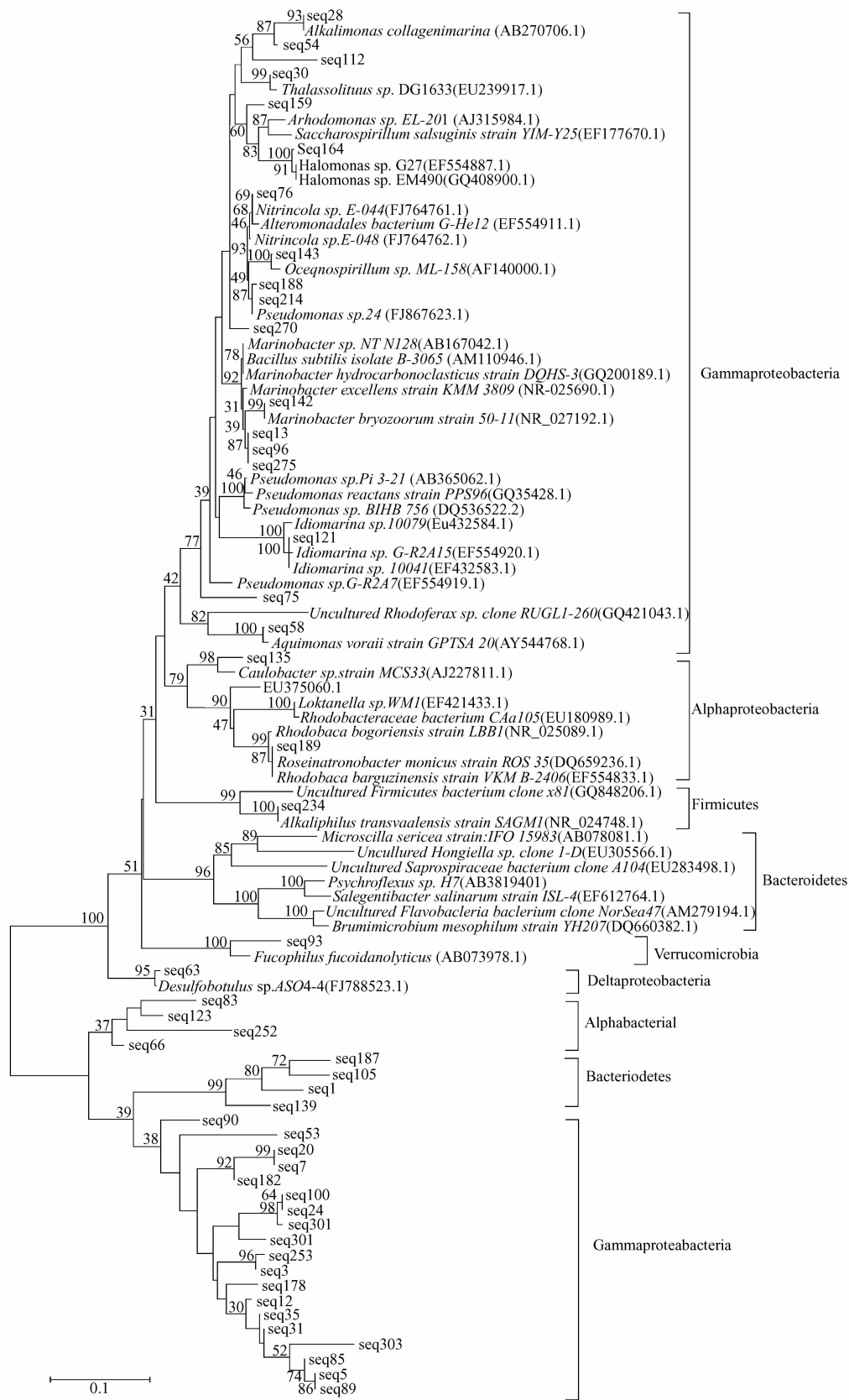


图5 以16S rRNA基因序列为基础的扎布耶茶卡盐湖细菌系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of the Bacteria in Zabuye Salt Lake based on 16S rRNA gene sequences. Evolutionary distances were calculated by the method with Kimura (1980) two-parameter calculation model and the topology was inferred by the neighbour-joining method based on bootstrap analysis of 100 replicates. Bar, 0.1 substitutions per nucleotide.

2.4 系统发育分析

根据所获得的具有明确分类地位的 72 个 16S rRNA 基因克隆序列构建细菌系统发育树(图 5)。从系统发育上可以看到 γ -变形菌纲占有绝对优势。Seq. 28, 29, 54, 57, 153, 247 与 γ -变形菌纲的 *Alkalimonas* 属可被看作一个单元,与该属中的菌株 *Alkalimonas collagenimarina* 相似性为 95% 或 99%。Seq. 30 与相似性为 96% 的 *Thalassolituus* sp. DG1633 也构成一个单元。分离自韩国的柴油降解菌——*Halomonas* sp. EM490 与 seq. 164 具 98% 相似性,进化距离最近。Seq76 与 *Nitrincola* sp. E-044 进化关系最近(99%),再加上 *Nitrincola* sp. E-048 和 *Alteromonadales bacterium* G-He12 组成一个单元。Seq143, 280 与 *Oceanospirillum* 属的 *Oceanospirillum* sp. ML-158 相似性最高(98%)。分离自格陵兰岛的菌株 *Pseudomonas* sp. 24 与 seq188, 214, 219, 224, 250 占据树上一个分枝。Seq. 142 与 *Marinobacter bryozorum* strain 50-11 最为匹配(98%),而 seq. 13, 96 和 275 则构成一个新的独立的分支。Seq. 121 与 *Idiomarina* 属的 *Idiomarina* sp. 10041 相似性最高(99%),再加上 *Idiomarina* sp. G-R2A15 三者成为一个分类单元。源自印度阿萨姆邦一个温泉中的 *Aquimonas voraii* strain GPTSA 20 与 seq. 58 最为相似(98%)^[12]。*Caulobacter* 属的 *Caulobacter* sp. strain MCS33 与 seq. 135 进化距离最小,而两者有 95% 的相似性。Seq. 189 与 seq. 241 与 α -变形菌纲的 *Rhodobaca barguzinensis* strain VKM B-2406 具有高达 99% 的同源性,连同 *Rhodobaca bogoriensis* strain LBB1 和 *Roseinatronobacter monicus* strain ROS35 共同组成一个分枝。*Alkaliphilus transvaalensis* strain SAGM1 与 seq. 234 相似性为 99%,二者组成厚壁菌门的一个单元。此外,seq. 93 与 *Fucophilus fucoidanolyticus* (相似性 89%), seq. 63 和 seq. 71 与 *Desulfobotulus* sp. ASO4-4 (相似性 98%) 也分别构成一个分支。还有一些序列,如 seq. 75, 112, 159, 270 形成独立的分支,可能代表新的分类单元。

然而在进化树的下半部分,40 个克隆序列与 23 个属进化距离较远,他们代表了新的分类单元,深入研究这些克隆序列的宿主菌对深入理解细菌多样性无疑具有重要的意义。

3 讨论

PCR 扩增的 16S rRNA 基因部分序列,片段长

度约为 1 kb,位置在 530 到 1492 之间。在这个范围内,细菌的 16S rRNA 共有 8 个可变区,7 个保守区。即使测序结果只有 700 bp,在这个范围内仍有 6 个可变区,5 个保守区。因此,范围在 530 - 1492 的细菌 16 S rRNA 基因部分序列具有较高的保守性,可以比较准确地说明嗜盐或耐盐细菌在系统进化树上的进化关系。同时,测序克隆是根据 ARDRA 分型结果挑取的,目的是为了保证所获得的序列信息可以更加客观真实地说明盐湖中细菌的组成与各类群的丰度。

值得一提的是,ARDRA 分析中划归一类的序列在系统发育树上的距离可能相距甚远,也就是说 ARDRA 分析与系统发育分析,二者的结果并不吻合。如在 ARDRA 中归为一个 OTU 的 seq. 8, 47, 53, 203, 只有 seq. 53 属于 *Pseudomonas*,而其它 3 个克隆序列都属于未培养序列。更为典型的是另一 OTU,有 seq. 13, 75, 80, 112 等组成,Blast 显示,seq. 13 属于 *Marinobacter*, seq. 75 为 *Pseudomonas*, seq. 112 是 *Nitrincola*,余下的 seq. 80 为未培养克隆序列。导致这种现象的原因可能为:ARDRA 分析只是针对几个酶切位点,如果 2 个异源序列恰好针对某种内切酶具有相同或相似的酶切位点,那么最后结果极有可能将其归为一类,而测序得到的是 16S rRNA 基因部分保守序列的全序列,分析结果更为可靠一些,这也是本研究只将 ARDRA 结果作为参考的原因。

通过对扎布耶盐湖细菌 16S rRNA 基因克隆序列所进行的系统发育分析,可知扎布耶盐湖中细菌具有丰富的多样性。它们主要分布在 *Alkalimonas*、*Pseudomonas*、*Bacillus*、*Marinobacter*、*Thalassolituus*、*Flexibacter*、*Nitrincola* 等 23 个嗜盐细菌属中。其中,seq. 13, 75, 96, 112, 159, 270, 275 这几个克隆与上述 23 个细菌属的关系较远,可能代表新的分类单元。在系统发育树的下部分,从 seq. 83 开始,这些克隆主要属于 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)三大分类单元,但是这 40 个克隆与已经菌属的进化距离较远,这些克隆极有可能代表全新的分类单元。Oren^[4]所述的假单胞菌科假单胞菌属中仅两个代表中:*Pseudomonas halophila* 和 *Pseudomonas beijerinckii*,根据表 1 可以看出,克隆序列中与已知序列同源性序列不高于 97% 的占总单胞菌序列的 25%,这些序列所代表的极有可能是新种。Oren^[4]起初记载交替单胞菌科(*Alteromonadaceae*)中只有一个属——*Marinobacter*

能在高盐生境下生长。Ivanova^[13]首次在西北太平洋 4000 – 5000 m 深的海水样品中分离到两个菌株——KMM 227T 和 231T, 并把它归类到该科中的新属——*Idiomarina*。自此以后, *Idiomarina* 属中新种的发现层出不穷。*Idiomarina baltica*^[14], *Idiomarina loihiensis*^[15], *Idiomarina fontislapidosi*^[16], *Idiomarina ramblicola*^[16] 和 *Pseudidiomarina marina*^[17] 等大大丰富了 *Idiomarina* 属的物种组成。Seq90 与 *Idiomarina* sp. G-R2A15 的同源性只有 96%, 很有可能代表 *Idiomarina* 属的一个潜在新种。

参考文献

- [1] 郑绵平, 卜令忠. 盐湖资源的合理开发与综合利用. 矿产保护与利用 (*Conservation and Utilization of Mineral Resources*), 2009(1): 17-22.
- [2] Oren A. Ecology of extremely halophilic microorganisms. // Vreeland R. H., et al. The Biology of Halophilic Bacteria. Boca Taton: CRC Press, 1993.
- [3] Satyanarayana T., Raghukumar C., Shivaji S. Extremophilic microbes: Diversity and perspectives. *Current Science* 2005, 89(1): 78-90.
- [4] Oren A. Bioenergetics Aspects of Halophilism. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1999, 63(2): 334-348.
- [5] 郑绵平. 论中国盐湖. 矿床地质 (*Mineral Deposits*), 2001, 20(2): 181-189.
- [6] 傅华龙. 扎布耶盐湖藻类资源的开发利用概况. 资源开发与市场 (*Resources Development & Market*), 1990(3): 183.
- [7] 范华鹏, 薛燕芬, 曾艳, 等. 西藏扎布耶茶卡盐碱湖古菌多样性的非培养技术分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*). 2003, 43(4): 401-408.
- [8] Mouné S, Caumette P, Matheron R, et al. Molecular sequence analysis of prokaryotic diversity in the anoxic sediments underlying cyanobacterial mats of two hypersaline ponds in Mediterranean salterns. *Microbiology ecology*, 2003(44): 117-130.
- [9] Paul A. Rochelle, Environmental molecular microbiology: Protocols and Applications. UK: Horizon Scientific Press. 2001.
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [11] Weidner S, Arnold W, Pühler A. Diversity of Uncultured Microorganisms Associated with the Seagrass *Halophila stipulacea* Estimated by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, 62(3): 766-771.
- [12] Saha P, Krishnamurthi S, Mayilra S, et al. *Aquimonas voraii* gen. nov., sp. nov., a novel gammaproteobacterium isolated from a warm spring of Assam, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55: 1491-1495.
- [13] Ivanova EP, Romanenko LA, Chun J, et al. *Idiomarina* gen. nov., comprising novel indigenous deep-sea bacteria from the Pacific Ocean, including descriptions of two species, *Idiomarina abyssalis* sp. nov. and *Idiomarina zobellii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 901-907.
- [14] Brettar I, Christen R, H? fle MG. *Idiomarina baltica* sp. nov., a marine bacterium with a high optimum growth temperature isolated from surface water of the central Baltic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 407-413.
- [15] Donachie SP, Hou S, Gregory TS, et al. *Idiomarina loihiensis* sp. nov., a halophilic γ -Proteobacterium from the Lō' ihi submarine volcano, Hawai' i. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 1873-1879.
- [16] Martinez-Cánovas MJ, Béjar V, Martinez-Checa F, et al. *Idiomarina fontislapidosi* sp. nov. And *Idiomarina ramblicola* sp. nov., isolated from inland hypersaline habitats in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 1793-1797.
- [17] Jean WD, Leu TY, Lee CY, et al. *Pseudidiomarina marina* sp. nov. and *Pseudidiomarina tainanensis* sp. nov. and reclassification of *Idiomarina homiensis* and *Idiomarina salinarum* as *Pseudidiomarina homiensis* comb. nov. and *Pseudidiomarina salinarum* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2009, 59: 53-59.

Bacterial Diversity in Zabuye Salt Lake of Tibet by Culture-Independent Approaches

Xianhui Zhang^{1,2,3}, Fanjing Kong^{1,2,3}*

(¹ Institute of Mineral Resources, Chinese Academy of Geological Sciences, Beijing 100037, China)
(² Key Laboratory of Saline Lake Resources and Environments, Ministry of Land and Resources, Beijing 100037, China)
(³ R&D Center of Saline Lake and Epithermal Deposit, Beijing 100037, China)

Abstract: [Objective] To get knowledge about bacterial diversity in Zabuye salt lake with the culture-independent approaches. [Methods] Total DNA was extracted from sediments sample of Zabuye salt lake, Tibet. The 16S rRNA gene was amplified by PCR with bacterial primer f530/r1492. Then the plasmid library of 16S rRNA genes was constructed. The positive clones were screened on plates with IPTG/X-gal/Ap. Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) was carried out with restriction enzymes *Hae* III, *Hha* I. With the help of culture-independent approaches, DNA was directly extracted from the sediment samples of Zabuye salt lake. After construction of 16S rRNA gene library, ARDRA (amplified rDNA restriction analysis) analysis was carried out. Some clones were selected to be sequenced according to the ARDRA patterns. These partial sequences of 16S rRNA gene were used for construction of the phylogenetic tree. [Results] The phylogenetic tree showed that some clones (57. 14% of total clones) belonged to 23 genera in γ -proteobacteria, α -proteobacteria, δ -proteobacteria, bacteroidetes, firmicutes, and verrucomicrobia. The rest clones were quite different and were most related with uncultured sequences, forming special division in the tree. [Conclusion] These finding showed much prolific bacteria diversity in Zabuye salt lake.

Keywords: Zabuye Salt lake; bacterial diversity; Culture-independent approaches; 16S rRNA gene; ARDRA

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (40772065,40572059)
* Corresponding author. Tel: +86-10-68999550; Fax: +86-10-689990776; E-mail: kfjbj2002@yahoo. com. cn
Received: 3 November 2009/Revised: 25 December 2009

《微生物学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要:基本要素包括研究目的、方法、结果和结论,并要求在文中给出“【目的】、【方法】、【结果】和【结论】”等字样。具体地讲就是研究工作的主要对象和范围,采用的手段和方法,得出的结果和重要结论。在结果和讨论中应写明本文的创新之处。
2. 综述摘要:包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望。
3. 英文摘要的撰写要点:英文摘要的内容应与中文摘要一致,但比中文摘要更详尽。要求在文中按照[Objective]、[Methods]、[Results]、[Conclusion]顺序分项撰写。英文摘要完成后,务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的,即使学术上可以达到刊出的水平,本刊也将推迟发表。
 - (1)在英语摘要中,不要使用任何汉字字符,包括标点、括号、温度、希腊字母等。
 - (2)建议使用第一人称,以此可区分研究结果是引用文献的还是作者的。
 - (3)建议用主动语态,被动语态表达拖拉模糊,尽量不用,这样可以免好多长句,以求简单清晰。
 - (4)摘要应当使用过去时态,语法正确,句子通顺。
 - (5)摘要中不用缩写语,除非是人人皆知的,如:DNA、ATP 等。
 - (6)句子的开头处最好不要使用数字。