

中国典型冻土区土壤可培养细菌多样性

李森¹, 冯海艳^{1*}, 杨忠芳¹, 刘长征^{1,3}, 夏学齐¹, 王诚煜¹, 江丽珍¹, 蒋宏忱^{2*}

¹中国地质大学, 地球科学与资源学院, 北京 100083

²生物地质与环境地质国家重点实验室, 中国地质大学, 北京 100083

³青海省第五地质矿产勘察院, 西宁 810028

摘要: 【目的】对比分析中国典型高纬度冻土区和高海拔冻土区土壤可培养细菌的多样性。【方法】采用 NM、TSA、R2A 3 种培养基分离培养不同冻土区土壤可培养细菌, 用通用引物扩增分离的细菌 16S rRNA 基因, 根据系统发育分析进行鉴定。【结果】从 6 个样品中得到冻土土壤可培养细菌的菌落数量为 $4.70 \times 10^3 - 2.57 \times 10^5$ cfu/g(土壤干重), 根据不同的菌落形态分离出 144 株可培养细菌。纯培养物的 16S rRNA 基因部分序列分析表明: 我国高纬度冻土区土壤样品中的细菌分别属于 Firmicutes 分支(59.52%)、Gammaproteobacteria 分支(38.10%)、Betaproteobacteria 分支(2.38%), 其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*) 的菌株为该区域的三大优势菌群。我国高海拔冻土区土壤样品中分离细菌属于 Gammaproteobacteria 分支(89.22%)、Firmicutes 分支(8.82%) 和 Bacteroidetes 分支(1.96%)。优势菌群为假单胞菌属(*Pseudomonas*)。【结论】我国高纬度冻土区和高海拔冻土区土壤具有较高的可培养细菌多样性; 不同类型冻土区土壤可培养细菌群落组成不同。本文研究结果将为我国冻土区土壤细菌资源研究与利用提供理论依据。

关键词: 冻土, 大兴安岭, 青藏高原, 可培养细菌多样性, 16S rRNA 基因

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011) 12-1595-10

冻土是指温度保持在 0℃ 或以下, 并出现冻结现象的土壤, 它是一种极其宝贵的自然资源, 占陆地生态系统中土壤面积的 26%^[1-3]。我国多年冻土面积占全国陆地总面积的 22.3%^[4-5], 广泛分布于高海拔地区和高纬度地区, 面积位居全球首位^[6]。冻土作为一种特殊的负温地质体^[7], 生长于其中的微生物对于环境的变化极其敏感, 这些极端微生物代表着生命对于环境的极限适应能力, 蕴涵着生命

进化历程的丰富信息, 也是生物遗传和功能多样性的宝库^[8]。

我国冻土有高纬度冻土和高海拔冻土两种, 它们都形成于负温环境下, 但在环境条件和土壤性态特征等方面均有一定的差异, 主要表现为: 高纬度冻土主要分布于东北地区, 纬度高而海拔低, 这类冻土的特征主要受高纬度的影响, 具有湿寒特点, 土壤有机质含量较高, pH 值较低, 不含 CaCO₃, 盐基不饱

基金项目: 国土资源部公益性行业科研专项(200911020-01); 中央高校基本科研业务费专项(2010ZY15)

* 通信作者。冯海艳, Tel: +86-10-82324054, E-mail: haiyan@cugb.edu.cn; 蒋宏忱, Tel: +86-10-82336374, E-mail: hongchen.jiang@gmail.com

作者简介: 李森(1986-), 女, 北京人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物方面研究。E-mail: flyfish1986@gmail.com

收稿日期: 2011-06-28; 修回日期: 2011-09-30

和;高海拔冻土主要分布于青藏高原以及西部高山地带,海拔高而纬度低,这类冻土特性主要受高海拔的影响,具有干寒特点,土壤有机质含量较低,pH值较高,盐基饱和,大多富含石灰^[3]。不同类型冻土环境下生活的微生物特性不同,因此其对极端温度的耐受性也不尽相同^[9],固研究不同冻土区土壤微生物种群结构、多样性等将有助于及时监测环境变化并采取有效应对措施。众多土壤微生物中细菌所占比例较大,且对于土壤物质循环及能量流动的贡献巨大。40多年来,我国冻土研究获得了长足发展,已处于国际领先地位,然而,对于冻土微生物的研究才刚刚起步^[6]。土壤细菌的研究中关于农耕区的报道较多,而对于冻土区土壤细菌,尤其是处于我国高纬度地带冻土区土壤细菌的报道较少。本研究中采用纯培养方法,从我国两类典型冻土区土壤样品中分离获得不同种类的细菌,采用菌落PCR方法和基于16S rRNA基因的序列分析,初步获得我国高纬度及高海拔冻土区土壤可培养细菌的群落结构和多样性,并比较了两者的异同。为进一步研究不同种群细菌在不同冻土区物质、能量循环中的作用奠定基础,并为冻土的研究和保护提供了基本资料 and 理论数据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 研究区域概况:本文研究中的高纬度冻土区分布于黑龙江省大兴安岭地区,气候属于寒温带湿润季风气候,全年年均气温 -4.5°C 左右,年均降水量400 mm–500 mm左右。区内林业资源丰富,普遍分布有季节冻土,西北部则有连续多年冻土、岛状多年冻土。高海拔冻土区分布于青藏高原地区,平均海拔高度在4000 m以上,大部分地区的最暖月均温在 15°C 以下,降水量较少,平均在400 mm左右。在特有的高原地质地理条件下形成了很多特有的土壤类型,在其上生长繁殖着极其珍贵的动、植物资源。

1.1.2 样品采集:土壤样品取自黑龙江省大兴安岭地区的高纬度冻土区以及青藏高原地区的高海拔冻土区,采样时间为2010年6月。在采样过程中,首先剥离土壤表面覆盖的凋落物,使用灭菌采样铲采集0–20 cm深的土壤样品分装于无菌50 ml离心管中,使用蓝冰 4°C 保存备用,在运输及保存过程中注意防止污染。具体采样点属性见表1,采样点位置信息见图1。

表1 样品采集信息

Table 1 Location information of samples

No. of sample	Location of sample	Soil type	Land-use type	Latitude	Longitude	Altitude
DZS1	Mohe Country, Heilongjiang Province (黑龙江省漠河县)	Brown coniferous forest soils	Coniferous forest	$52^{\circ}58'48''$	$122^{\circ}28'42''$	439
DZZ1	Mohe Country, Heilongjiang Province (黑龙江省漠河县)	Peat mire soils	Meadow	$52^{\circ}58'50''$	$122^{\circ}28'43''$	443
XZGEM02	The farm of Gexi, Guolemude Country, Ge'ermu City, Qinghai Province (青海省格尔木市郭勒木德乡格西农场)	Gray-brown desert soils	rape	$36^{\circ}25'56''$	$94^{\circ}48'13''$	2813
XZWDL01	Wudaoliang, Qinghai Province (青海省五道梁)	Alpine steppe soils	Meadow	$35^{\circ}9'58''$	$93^{\circ}2'15''$	4688
XZWL01	Wuli, Qinghai Province (青海省乌丽)	Alpine meadow soils	Meadow	$34^{\circ}22'28''$	$92^{\circ}39'59''$	4573
XZTTH01	Tuotuo river, Tanggula-Mountain Country, Qinghai Province (青海省唐古拉山乡沱沱河)	Meadow swamp soil	Meadow	$34^{\circ}5'44''$	$92^{\circ}20'22''$	4775

1.1.3 主要试剂和仪器: rTaq DNA聚合酶购自TaKaRa公司;DNA凝胶回收试剂盒购自北京擎科新业生物技术有限公司;PCR仪购自美国Bio Red公司。

1.1.4 引物:采用细菌通用引物 Bac27F

(5-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3)和 U1492R (5-TACCTTGTTACGACTT-3),PCR引物由北京擎科新业生物技术有限公司合成。

1.1.5 培养基 (g/L):牛肉膏蛋白胨培养基 (NM)的配制参照文献[10];TSA培养基的配制参照文献

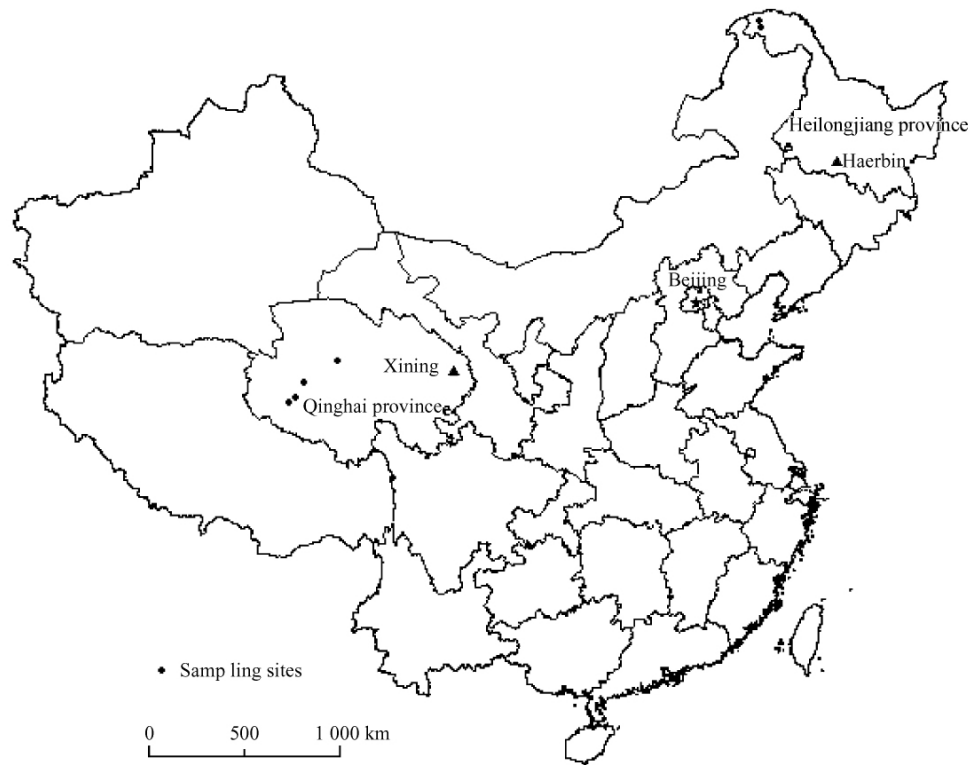


图1 采样点分布图

Fig. 1 Location of samples.

[11],其中 NaCl 5 g,并加入酵母粉5 g;R2A 培养基的配制参照文献[12-13],其中未加入蛋白胨,干酪素加0.25 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g,其他组分与含量与参考文献同。

1.2 土壤理化指标测定

土壤基本理化指标的测定按照常规方法^[14],有机碳用分光光度法,总氮用凯氏容量法,总磷用X射线荧光光谱法(XRF),土壤pH采用离子选择性电极法。含水率的测定用烘干法^[15]。

1.3 细菌的稀释平板培养

细菌的分离培养采用稀释平板培养法,具体方法参照文献^[16],15℃倒置恒温培养3-5 d。

1.4 优势菌种的纯化

根据菌落大小、颜色、表面光滑程度等形态特征选取不同的菌株接种于对应培养基中,25℃倒置恒温培养至菌落肉眼可见,4℃保存。

1.5 16S rRNA 基因的扩增及 PCR 扩增产物的回收与纯化

用直接挑取菌落于50 μl 无菌双蒸水水浴(95℃)处理后制成的裂解液作为模板^[17],采用细菌

通用引物 Bac27F 和 U1492R 扩增细菌 16S rRNA 基因,扩增片段长度为1.5 kb。PCR 反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min 50 s,36 个循环;72℃ 7 min。用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收 PCR 扩增产物。

1.6 系统发育分析

用 BigDye Terminator version 3.1 (ABI, Foster City, CA, USA)生化试剂和 Bac27F 引物分析测定6个样品中分离培养得到的144株细菌的16S rRNA 基因序列。用 ABI 3730 自动测序仪来完成测序工作。用 BioEdit 将所获得的菌株序列进行编辑整理。利用 DOTUR 软件^[18]分析序列,具有3%的序列差别者定义为分类操作单元(即 OTU,Operational taxonomic unit)。在每个 OTU 中选取1株菌的序列作为代表序列上传至 GenBank,登录号为 JN112901-JN112926。并将其与 GenBank 数据库中的序列进行 Blast 比对。根据 Blast 比对结果,选取相似度较大的同源序列作为参考序列。将选取的同源参照序列和本研究中所得到的 OTU 代表序列结合在一起,通过 BioEdit 软件中的 ClustalW Multiple Alignment

命令,按照最大同源性的原则将序列对齐^[19],并将对齐后的序列文件转为 MEGA 4.0 软件所需的输入格式。最后,用 MEGA 4.0 软件中的 Neighbor-joining 方法,按照 JC(Jukes-Cantor)单参数距离模型来估算遗传距离并进行系统进化分析^[20-21]。构建系统进化树时,迭代运算 1000 次。

1.7 细菌多样性分析

定义 16S rRNA 基因序列同源性大于 97% 作为同一分类单元^[22]采用 Simpson 多样性指数(D)^[11], Shannon-Wiener 多样性指数(H)和 Shannon-Wiener 均匀度指数(E)计算多样性^[23]。

1.8 菌种的保存

每株菌的冻存做两个重复,将 450 μ L 甘油与

600 μ L 菌液混合均匀, -80 $^{\circ}$ C 保存。

2 结果和分析

2.1 土壤基本理化性质

分析我国高纬度及高海拔冻土区土壤理化性质可知(表 2):含水率在 4.41% - 59.19% 之间;总碳量 12.57 - 160.65 g/kg;总氮量 578.34 - 8019.65 mg/kg;总磷量 332.0 - 1339.8 mg/kg;有机碳量 5.25 - 112.55 g/kg;pH 变化范围在 5.12 - 9.09 之间。高纬度冻土区土壤中各种养分含量较高,且 pH 值较低;高海拔冻土区不同土壤样品中养分含量不同,且 pH 值较高纬度冻土区土壤样品高。

表 2 土壤样品基本理化参数

Table 2 Physico-chemical characteristics of the Frozen soil samples

No. of sample	Moisture/%	Total C/(g/kg)	Total N/(mg/kg)	Total P/(mg/kg)	Organic C/(g/kg)	pH
DZS1	22.09	29.11	1683.61	527.6	22.26	7.26
DZZ1	59.19	160.65	8019.65	1339.8	112.55	5.12
XZGEM02	12.44	18.41	578.34	723.9	5.25	9.09
XZWDL01	4.41	12.57	1156.68	332.0	6.00	8.60
XZWL01	14.82	21.94	771.12	455.2	7.88	8.70
XZTTH01	37.82	71.51	4742.39	615.4	45.64	7.90

2.2 我国典型冻土区土壤细菌分离与计数

根据菌株的颜色、大小、表面光滑程度等表型特征,从采于我国高纬度及高海拔冻土区的 6 个土壤样品中共分离获得了 144 株形态各异的可培养细菌。其中从高纬度冻土区土壤样品中获得可培养细菌 42 株,

从高海拔冻土区土壤样品中获得 102 株可培养细菌。

利用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NM)、胰蛋白胨大豆琼脂培养基(TSA)、R2A 琼脂培养基(R2A)3 种培养基对 6 个冻土样品中的菌落进行计数,结果见表 3。

表 3 冻土区土壤样品细菌在不同培养基上的计数结果

Table 3 Culturable bacterial counting in the frozen soil samples on different media

No. of Sample	Colony numbers/(cfu/g soil)			
	NM	TSA	R2A	Average
DZS1	7.96×10^4	7.44×10^4	2.57×10^5	1.37×10^5
DZZ1	4.41×10^4	1.47×10^4	1.57×10^5	7.19×10^4
XZGEM02	3.15×10^4	1.14×10^4	6.40×10^3	1.64×10^4
XZWDL01	5.65×10^4	5.65×10^4	5.02×10^4	5.44×10^4
XZWL01	1.88×10^4	4.70×10^3	7.04×10^3	1.02×10^4
XZTTH01	9.97×10^4	1.09×10^5	1.32×10^5	1.14×10^5

结果表明分离得到的 144 株细菌,可分为 29 个不同的分类单元。Simpson 多样性指数(D)为 0.88,Shannon-Wiener 指数(H)为 3.89,Shannon-Wiener 均匀度指数(E)为 0.80。其中分离自高纬度冻土区土壤样品的 42 株细菌共分为 15 个不同的分类单元,Simpson 多样性指数(D)为 0.82,

Shannon-Wiener 指数(H)为 3.18,Shannon-Wiener 均匀度指数(E)为 0.81;分离自高海拔冻土区土壤样品中的 102 株细菌可分为 11 个分类单元,Simpson 多样性指数(D)为 0.66,Shannon-Wiener 指数(H)为 2.16,Shannon-Wiener 均匀度指数(E)为 0.62。结果显示,我国高纬度冻土区土壤样品可培

养细菌的多样性指数的指标均略高于我国高海拔冻土区土壤样品获得的多样性(表4)。

表4 不同冻土采样区土壤可培养细菌多样性指数

Table 4 Culturable bacterial diversity indices in the frozen soil samples

Samples District	Diversity indexes		
	Simpson's diversity index (D)	Shannon-Wiener's diversity index (H)	Shannon-Wiener's evenness index (E)
High-latitude area	0.82	3.18	0.81
High-altitude area	0.66	2.16	0.62

2.3 我国典型冻土区土壤可培养细菌 16S rRNA 基因系统发育分析

2.3.1 高纬度冻土区土壤可培养细菌系统发育分

析:我国高纬度冻土区土壤样品中分离细菌的 16S rRNA 基因序列同源性的系统发育分析结果(图2)表明,属于 Gammaproteobacteria 分支的 16 株细菌占高纬度冻土区土壤中分离菌株的 38.10%,它们均与假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 具有较高的相似性,同源序列相似性 99% ~ 100%,成为我国高纬度冻土区土壤可培养细菌中的第一大优势菌群。在这种水平上,有 5 株细菌与 *Pseudomonas frederiksbergensis* 有较高的相似性,分别有 3 株与 *Pseudomonas mediterranea* 及 *Pseudomonas mandelii* 有较高的相似性,有 2 株与 *Pseudomonas borealis* 相似性较高,另外与 *Pseudomonas migulae*、*Pseudomonas antarctica*、*Pseudomonas lini* 相似性较高的细菌各有 1 株。

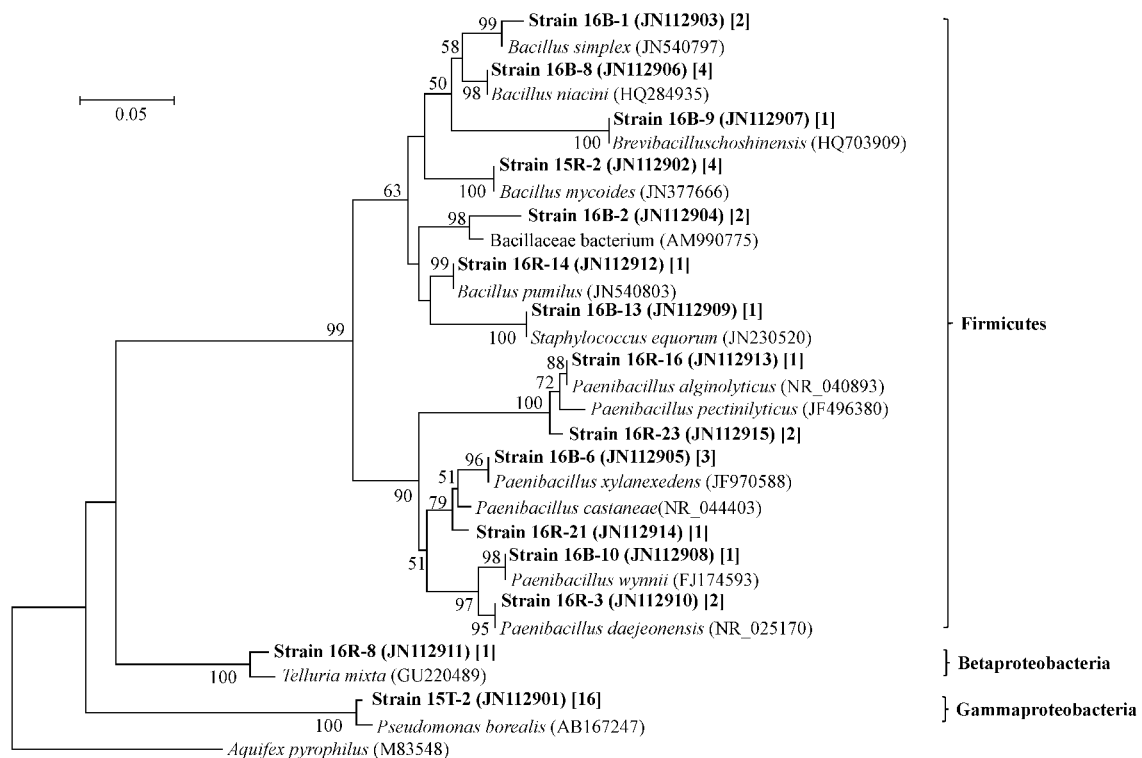


图2 分离自我国高纬度冻土区土壤可培养土壤细菌 16S rRNA 基因序列(15 个 OTUs)构建的系统发育树
Fig. 2 Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene partial sequences of 15 OTUs isolated from the frozen soil samples in High-latitude area. It shows that the phylogenetic relationships of isolates gene sequences to closely related sequences obtained from the GenBank database. Data in parentheses are the GenBank accession numbers and the numbers in square bracket represent the number of isolates in one OTU. *Aquifex pyrophilus* (M83548) was used as outgroup. Bootstrap values of >50% (for 1000 iterations) are shown in this figure. The scale bar indicates the Jukes-Cantor distances. Bar, 5% sequence divergence.

另一大分支 Firmicutes 的 25 株细菌占高纬度冻土区土壤中分离菌株的 59.52%,其中有 11 株细菌与芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 关系密切,同源序列相似性 98% - 100%,成为该研究地区中分离得到的第二大优势菌群,其中各有 4 株与单纯芽胞杆菌 (*Bacillus*

simplex) 和蕈状芽胞杆菌 (*Bacillus mycoides*) 关系密切,与 *Bacillus psychrosaccharolyticus*、短小芽胞杆菌 (*Bacillus pumilus*)、*Bacillus niacini* 关系密切的细菌各有 1 株;10 株菌在细菌系统学与类芽胞杆菌属 (*Paenibacillus*) 关系密切,同源序列相似性 98% -

100% ,是分离得到的第三大优势菌群 ,其中有 2 株细菌与 *Paenibacillus pectinilyticus* 有较高的相似性 ,与 *Paenibacillus alginolyticus*、*Paenibacillus xylanexedens*、*Paenibacillus amylolyticus*、*Paenibacillus taichungensis*、*Paenibacillus castaneae*、*Paenibacillus wynnii*、*Paenibacillus daejeonensis*、*Paenibacillus terrae* 关系密切的细菌各有 1 株 ; 1 株与类短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*) 中桥石短芽孢杆菌 (*Brevibacillus choshinensis*) 关系密切 ,同源序列相似性为 99% ; 1 株与葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 中马胃葡萄球菌 (*Staphylococcus equorum*) 关系密切 ,同源序列相似性为 99% ; 另外 , 还有 2 株属于芽孢杆菌科 (Bacillaceae) 中的未分类单元。

Betaproteobacteria 分支中的 1 株菌与 *Massilia* 属中的 *Telluria mixta* 相似性较高 ,同源序列相似性 98% ,该分支占高纬度冻土区土壤中分离菌株的 2.38% 。

2.3.2 高海拔冻土区土壤可培养细菌系统发育分析: 从我国高海拔冻土区的 4 个土壤样品中分离得到的 102 株细菌 ,16S rRNA 基因部分序列的系统发

育分析结果 (图 3) 表明 , 属于分支 Gammaproteobacteria 的 91 株菌占高海拔冻土区土壤中分离菌株的 89.22% ,其中有 86 株在细菌系统学与假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 关系密切 ,同源相似性 99% ~ 100% ,是高海拔冻土区土壤可培养细菌中的绝对优势菌群 , 其中与 *Pseudomonas frederiksbergensis* 相似性较高的有 26 株 ,是高海拔冻土区土壤可培养细菌中的第一大优势菌群 ; 有 25 株与 *Pseudomonas mandelii* 相似性较高 ,为该研究区第二大优势菌群 ; 另外 , 与荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 关系密切的有 23 株 ,为第三大优势菌群 ; 与 *Pseudomonas lini* 关系密切的有 5 株 ; 3 株菌与 *Pseudomonas syringae* 关系密切 ; 与 *Pseudomonas grimontii*、*Pseudomonas cannabina*、*Pseudomonas brassicacearum*、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 相似性较高的各有 1 株。5 株在细菌系统学与不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 关系较为密切 ,同源序列相似性 99% , 其中有 4 株与乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) 关系密切 , 1 株与 *Acinetobacter johnsonii* 关系密切。

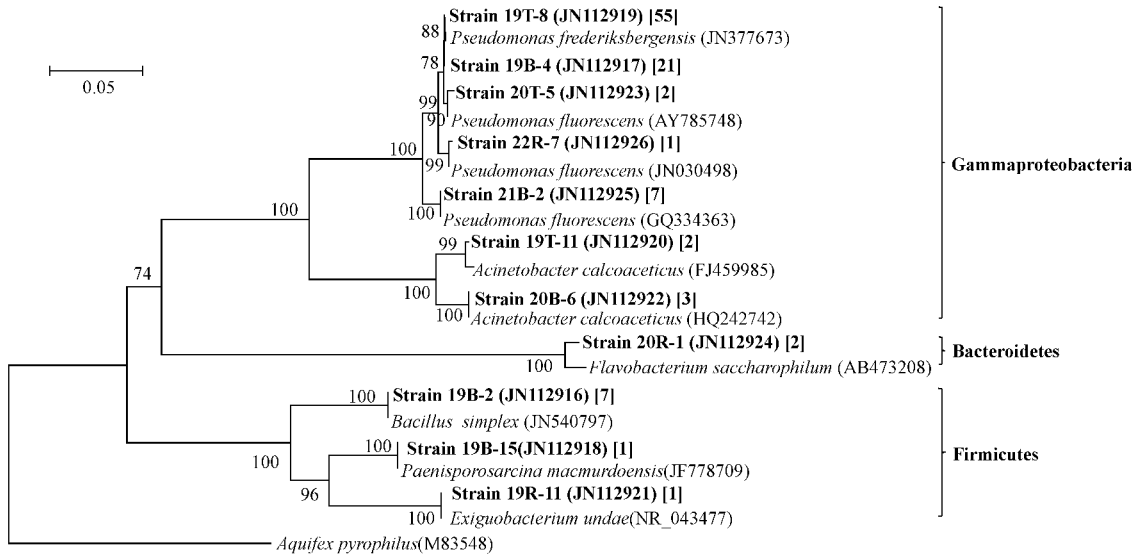


图 3 分离自我国高海拔冻土区土壤可培养土壤细菌 16S rRNA 基因部分序列 (11 个 OTUs) 构建的系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree based on 16S rRNA partial sequences of 11 OTUs isolated from the Frozen soil samples in High-altitude area. It shows that the phylogenetic relationships of isolates gene sequences to closely related sequences obtained from the GenBank database. Data in parentheses are the GenBank accession numbers and the numbers in square bracket represent the number of isolates in one OTU. *Aquifex pyrophilus* (M83548) was used as outgroup. Bootstrap values of > 50% (for 1000 iterations) are shown in this figure. The scale bar indicates the Jukes-Cantor distances. Bar , 5% sequence divergence.

属于 Firmicutes 分支的 9 株细菌占高海拔冻土区土壤中分离菌株的 8.82% , 7 株在细菌系统学与单纯芽孢杆菌 (*Bacillus simplex*) 关系密切 ,同源序列相似性 100% ; 1 株在细菌系统学与 *Paenisporosarcina macmurdoensis* 关系密切 ,同源序列相似性 99% ; 另外

还有 1 株在细菌系统学与 *Exiguobacterium undae* 关系密切 ,同源序列相似性 99% 。

属于 Bacteroidetes 分支的 2 株菌占高海拔冻土区土壤中分离菌株的 1.96% ,它们在系统系统学与黄杆菌属 (*Flavobacterium*) 关系密切 ,同源序列相似性为

98% 其中1株与 *Flavobacterium saccharophilum* 关系密切,另外1株与 *Flavobacterium aquidurense* 关系密切。

2.3.3 我国典型冻土区土壤可培养细菌多样性分析:从我国典型冻土区土壤中分离得到的144株细菌,与假单胞菌属(*Pseudomonas*)中 *Pseudomonas frederiksbergensis*、*Pseudomonas mandelii*、*Pseudomonas lini* 这3个物种在细菌系统学关系密切的菌群,在高纬度及高海拔冻土区土壤中都获得了分离培养。另外,与单纯芽胞杆菌(*Bacillus simplex*)关系密切的菌群也在两个冻土区的土壤得到了分离培养。从高纬度冻土区土壤中分离得到的,与类芽胞杆菌属(*Paenibacillus*)、类短短芽胞杆菌属(*Brevibacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和 *Massilia* 属关系密切的菌群,以及与 *Pseudomonas mediterranea*、*Pseudomonas borealis*、*Pseudomonas migulae*、*Pseudomonas antarctica*, 蕈状芽胞杆菌(*Bacillus mycoides*)、*Bacillus psychrosaccharolyticus*、短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*)、*Bacillus niacini* 关系密切的细菌均未从高海拔冻土区土壤中分离得到。而从高海拔冻土区土壤中分离获得的与不动杆菌属(*Acinetobacter*)、*Paenisporosarcina* 属、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*)关系密切的细菌,以及与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、*Pseudomonas syringae*、*Pseudomonas grimontii*、*Pseudomonas cannabina*、*Pseudomonas brassicacearum*、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)关系密切的菌群也均未在高纬度冻土区土壤中分离获得。这些都表明,在我国不同冻土区土壤中呈现出丰富的细菌多样性。但由于不同冻土区独特的地理位置及环境特点,不同冻土区土壤中的可培养细菌种群结构不尽相同。

3 讨论

在本文中,选取了高纬度及高海拔冻土两种典型冻土土壤进行细菌的分离培养,二者所使用的培养基以及成分相同。但结果表明,不同冻土区土壤中分离获得的菌落数量不同,可培养细菌多样性以及群落结构也不同。分析出现这种现象的可能原因如下:土壤微生物生长所必需的物质基础包括碳源、氮源、无机盐、生长因子以及水分^[24],这些物质类型的不同以及量的多寡必然影响土壤微生物的数量以及种类。在自然环境中,影响上述微生物生长物质基础的因素较为复杂,且相互影响,主要包括植被、土地利用方式以及地理位置、气候条件等。植被是土壤微生物赖以生存的有机营养物和能量的重

要来源,影响着土壤微生物定居的物理环境^[25],由于植被种类、耕作方式、物质组成、物质进入土壤量的大小、水热状况、施肥管理等方面的明显差异,导致土壤的物理、化学及生物学性状均有明显不同^[26]。与此同时,不同的地理位置会影响环境、气候等因素。在不同的气候条件下,由不同母岩发育而来的土壤类型不同,决定了土壤颗粒组成、湿度、温度、pH值等理化性状的差异,以上影响因素均可能导致土壤微生物区系多样性及组成上的变化^[27]。综上所述,由于本研究中两个冻土区所处的地理位置不同,土壤类型、土地利用方式(表1)以及土壤理化性质(表2)等方面均有一定的差异,固两个冻土区土壤可培养细菌数量、多样性以及群落结构均不相同。另有大量研究表明,土壤微生物数量、生物量等方面与土壤养分之间密切相关^[28-33],且变化趋势大致与土壤养分含量的变化一致。但有时也会出现一些特殊情况,造成这一现象的主要原因可能与培养基的成分以及培养条件等方面有关。在使用稀释平板培养法对菌落进行分离的过程中,培养基的成分对培养物的情况起着至关重要的作用。在本研究中所使用的培养基主要针对异养型以及好氧性细菌,对于在原环境中自养、厌氧型细菌会有一定的限制作用。上述实验中,虽然 DZZ1 及 XZTTH01 样品中的养分含量较高(表2),但可培养菌落数目未达到最大。出现这一现象的主要原因可能是原位环境的土壤含水量较高,由于长期淹水环境,生长于其中的微生物包含很大一部分厌氧型细菌,而本研究中未隔绝氧气的培养条件可能造成对于细菌生长数量的限制。从本研究中还可知:我国高纬度冻土区土壤样品中可培养细菌多样性指数略高于高海拔冻土区土壤,分析其可能原因如下:位于黑龙江省大兴安岭地区的高纬度冻土区中主要分布着寒带森林和温带草原^[29],这两种土地利用类型是大兴安岭地区的常见类型,本研究中采样区域覆盖了这两种主要的土地利用类型。该区域是我国唯一的寒温带地区,森林以及草地在气候、土壤情况、人类活动等方面与我国其他林区与草地相比有许多独特之处^[29]。大兴安岭地区林地土壤表层有比较厚的枯枝落叶层覆盖,有机质含量高,且有充足的养分和水分,同时,温度和通气状况适宜,有利于微生物的生存,腐殖质层更是有大量的养分,是微生物生活的主要场所^[34]。另外,目前对于黑龙江省大兴安岭地区的高纬度冻土区土壤细菌研究的相关报道较少,并且该地区拥有大面积的森林,这些都使得其受到的人为干扰较其它地区少,对于土壤及土壤中微生物的干扰也随之减少,对其破坏性较小,因此获得的可培养

细菌多样性较高。

关于冻土的研究,现今正处于快速发展阶段。鉴于纯培养方法具有一定的局限性,人们已逐渐将分子生物学方法广泛应用到土壤微生物多样性的研究中。但分离培养方法仍是土壤微生物以及物种多样性研究中极其重要的手段,占有举足轻重的地位。它可以用于获得微生物完整的基因序列,能更直接地鉴别分离得到菌株的种类及所占比例^[35],还可以直观地获得其形态、生理特性、代谢功能以及对环境响应等方面的信息。在此基础上获取有用的代谢产物,同时结合多种生物技术用于土壤修复等。鉴于以上,新世纪微生物学者的一项重要任务就是对未培养微生物的分离培养^[36]。综上所述,纯培养技术与分子生物学方法行之有效地结合将有助于阐明冻土微生物多样性与植物种类、代谢产物以及不同碳源之间的相互关系,这些信息的获得可以使人类更好地应对全球变暖所带来的不利影响^[37]。

致谢 在野外样品的采集和实验室室内培养工作中,中国地质大学(北京)海洋学院张勇、地球科学与资源学院黄柳琴等同学给予了无私的帮助。在此一并表示衷心的感谢!

参考文献

- [1] Williams PJ, Smith MW. The Frozen Earth: Fundamentals of Geocryology. Cambridge: Cambridge University Press, 1989: 306.
- [2] Steven B, Briggs G, McKay CP, Pollard WH, Greer CW, Whyte LG. Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample from the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 59: 513-523.
- [3] 赵其国,王浩清,顾国安. 中国的冻土. *土壤学报 (Acta Pedologica Sinica)*, 1993, 30(4): 341-354.
- [4] 冯虎元,马晓军,章高森,白玉,费贯清,程国栋,安黎哲,刘光琇. 青藏高原多年冻土微生物的培养和计数. *冰川冻土 (Journal of Glaciology and Geocryology)*, 2004, 26(2): 182-187.
- [5] Qiu GQ, Cheng GD. Permafrost in China: past and present. *Permafrost and Periglacial Processes*, 1995, 6(1): 3-14.
- [6] 刘光琇,马晓军,陈拓,安黎哲,王勋陵. 冻土微生物研究进展与意义. *冰川冻土 (Journal of Glaciology and Geocryology)*, 2004, 26(2): 188-191.
- [7] 杨思忠,金会军,魏智,吉延峻,何瑞霞. 微生物对冻土生境的适应以及对全球变化和寒区工程扰动的响应: 进展与展望. *冰川冻土 (Journal of Glaciology and Geocryology)*, 2007, 29(2): 279-285.
- [8] 白玉. 天山冻土的系统多样性分析及生长特性的研究. 兰州大学的博士毕业论文, 2004.
- [9] 杨红露,秦纪洪,孙辉. 冻融交替对土壤 CO₂ 及 N₂O 释放效应的研究进展. *土壤 (Soils)*, 2010, 42(4): 519-525.
- [10] 蔡信之,黄君红. 微生物学. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [11] 兰晓君,肖婷,邝海菊,何香,王灵,艾尔肯·热合曼,古丽斯玛依·艾拜都拉. 金川镍矿可培养细菌的多样性及耐镍菌株筛选. *生物技术 (Biotechnology)*, 2009, 19(4): 22-26.
- [12] Kawai M, Matsutera E, Kanda H, Yamaguchi N, Tani K, Nasu M. 16S Ribosomal DNA-Based Analysis of Bacterial Diversity in Purified Water Used in Pharmaceutical Manufacturing Processes by PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(2): 699-704.
- [13] 胡元森,李翠香,孙富林,吴坤,贾新成. 不同培养基组合提高土壤细菌可培养性的研究. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2007, 47(5): 882-887.
- [14] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 1999.
- [15] 关连珠. 普通土壤学. 北京: 中国农业大学出版社, 2006.
- [16] 沈萍,陈向东. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [17] Gussow D, Clackson T. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(10): 4000.
- [18] Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 1501-1506.
- [19] 戴欣,王保军,黄燕,张平,刘双江. 普通和稀释培养基研究太湖沉积物可培养细菌的多样性. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2005, 45(2): 161-165.
- [20] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [21] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [22] Suzuki MT, Rappe MS, Haimberger ZW, Winfield H, Adair N, Strobel J, Giovannoni SJ. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63: 983-989.
- [23] 陈梦. 对生态系统及生物多样性等理论问题的探讨. 南京林业大学学报: 自然科学版 [*Journal of Nanjing*

- Forestry University (Natural Sciences)*], 2003 , 27 (5) : 30-34.
- [24] 沈萍, 陈向东. 微生物学. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [25] 周桔, 雷霆. 土壤微生物多样性影响因素及研究方法的现状与展望. 生物多样性 (*Biodiversity Science*), 2007, 15(3): 306-311.
- [26] 李忠佩, 吴晓晨, 陈碧云. 不同利用方式下土壤有机碳转化及微生物群落功能多样性变化. 中国农业科学 (*Scientia Agricultura Sinica*), 2007, 40(8): 1712-1721.
- [27] 胡亚林, 汪思龙, 颜绍馥. 影响土壤微生物活性与群落结构因素研究进展. 土壤通报 (*Chinese Journal of Soil Science*), 2006, 37(1): 170-176.
- [28] 刘明, 李忠佩, 张桃林. 不同利用方式下红壤微生物生物量及代谢功能多样性的变化. 土壤 (*Soils*), 2009, 41(5): 744-748.
- [29] 冯保平, 高润宏, 张秋良, 赵全民. 不同经营方式下兴安落叶松林土壤微生物年季动态研究. 内蒙古农业大学学报 (*Journal of Inner Mongolia Agricultural University*), 2009, 30(4): 74-79.
- [30] 邵玉琴, 赵吉, 杨颖. 恢复草地和退化草地土壤之间土壤性质微生物种群类别分布. 中国沙漠 (*Journal of Desert Research*), 2004, 24(2): 223-226.
- [31] Sessitsch A, Weilharter A, Gerzabek M, Kirchmann H, Kandeler E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 4215-4224.
- [32] Yang YH, Yao J, Hu S, Qi Y. Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: a study with RAPD marker. *Microbial Ecology*, 2000, 39:72-79.
- [33] Fierer N, Schimel JP, Holden PA. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(1): 167-176.
- [34] 徐文熙, 王继华, 张雪萍, 韩丽丽, 李春晓, 辛莉. 大兴安岭森林土壤微生物生态分布研究. 哈尔滨师范大学自然科学学报 (*Natural Sciences Journal of Harbin Normal University*), 2009, 25(1): 67-70.
- [35] Connon SA, Giovannoni SJ. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68: 3878-3885.
- [36] 焦瑞身. 新世纪微生物学者的一项重要任务——未培养微生物的分离培养. 生物工程学报 (*Chinese Journal of Biotechnology*), 2004, 20(5): 641-645.
- [37] 王静, 盛下放, 曹建芳, 张树奎, 张垠, 何琳燕. 南京小龙山钾矿区植物根际可培养细菌的遗传多样性分析. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(7): 867-873.

Diversity of culturable bacteria in the typical frozen soil areas in China

Miao Li¹, Haiyan Feng^{1*}, Zhongfang Yang¹, Changzheng Liu^{1,3}, Xueqi Xia¹, Chengyu Wang¹, Lizhen Jiang¹, Hongchen Jiang^{2*}

¹ School of the Earth Sciences and Resources, China University of Geosciences, Beijing 100083, China

² State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Beijing 100083, China

³ Fifth Institute of Geological and Mineral Exploration of Qinghai Provincial Bureau of Geology and Mineral Resources, Xining 810028, China

Abstract: [Objective] The diversity of culturable bacteria in the six frozen soils from High-latitude area and High-altitude area were analyzed by using culture-dependent approaches. [Methods] Three solidified media were used to isolate

Supported by the Non-profit Industry Financial Program of Ministry of Land and Resources of the PRC (200911020-01) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2010ZY15)

* Corresponding authors. Haiyan Feng, Tel: +86-10-82324054, E-mail: haiyan@cugb.edu.cn; Hongchen Jiang, Tel: +86-10-82336374, E-mail: hongchen.jiang@gmail.com

Received: 28 June 2011/Revised: 30 September 2011

culturable bacteria. Bacterial 16S rRNA genes of the isolates were PCR amplified using bacteria-universal primers , and then were sequenced. The resulting bacterial 16S rRNA gene sequences were subjected to phylogenetic analysis.

[Results] The abundance of culturable bacteria ranged from 4.70×10^3 to 2.57×10^5 colony forming units (CFU) per gram of soils (dry weight). A total of 144 bacterial strains were obtained. The bacterial isolates from the High-latitude area were affiliated with three phyla (Firmicutes , Gammaproteobacteria , and Betaproteobacteria) with *Pseudomonas* , *Bacillus* , and *Paenibacillus* strains being dominant. The bacterial isolates from High-altitude area could be grouped into three different phyla (Gammaproteobacteria , Firmicutes , and Bacteroidetes) with *Pseudomonas* strains be dominant.

[Conclusion] The culturable bacteria are abundant and diverse in the frozen soils of High-latitude and High-altitude areas. The results also showed that the culturable bacterial community structure varied among different research areas. Our data have implications for a better understanding of culturable bacterial community in the frozen soils in China.

Keywords: frozen soils , the Greater Khingan Range , Tibetan Plateau , diversity of culturable bacteria , 16S rRNA gene

(本文责编:王晋芳)

Looking for a director of research & development laboratory

Rong Xi Science & Technology Company is a high-tech company devoted to introducing advanced biotech products to the market, with a registered capital of 50 million Chinese Yuans. The company owns well-equipped molecular biology labs with a total floor space of 525 square meters in Shingjingshan District, Beijing.

The candidate must have:

1. Ph.D. in molecular biology, microbiology or biochemistry;
2. 5-10 years work experience;
3. 1-3 years oversea work experience;
4. Passion for success;
5. Dedication to the field pursued.

The candidate is responsible for:

1. Writing proposal;
2. Persuading board to invest in the project;
3. Hiring research associate or technician;
4. Carrying out and supervising the research;
5. Submitting monthly progress report to the president;
6. Communication to outsiders if needed.

If you meet above requirements, please send your CV and at least three names of references to RXKJ0808@163.com

The benefits:

1. Salary is negotiable;
2. Free two-bed room apartment within 10 minutes walk to the lab;
3. Bonus according to contribution;
4. All other conditions are negotiable.