

新疆特殊生境岩石内生细菌末端限制性片段长度多态性技术分析

牟文婷¹, 张涛², 孙建², 曾军², 徐赢华², 吴尊凤², 胡雯², 娄恺^{2*}

¹ 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046

² 新疆农业科学院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091

摘要: 【目的】了解新疆特殊生境不同类型岩石内生细菌的组成及多样性。【方法】采用末端限制性片段长度多态性技术 (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP) 分析新疆乌苏花岗岩 (1 号样)、一号冰川和木垒变质岩 (2, 3 号样)、裕民和托克逊岩石漆 (4, 5 号样) 内生细菌群落。【结果】样品间多样性指数变化不大; 聚类分析表明岩石类型相同, 其相似性较高, 2 号样和 3 号样聚为一支并与 1 号样再聚为一支, 4 号样与 5 号样聚为一支; 各样品共有种群为厚壁菌门 (Firmicutes)、放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门 (Proteobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes), 1 号样存在酸杆菌门 (Acidobacteria), 2 号样存在浮霉菌门 (Planctomycetes); 除 5 号样优势类群为放线菌门 (29.3%) 外, 其它 4 个样品均为变形菌门, 只是所占比例略有不同。【结论】生境不同的同类型岩石的内生细菌群落组成存在差异, 各类岩石中可能存在大量未知细菌新种。

关键词: 岩石内生细菌, T-RFLP, 多样性

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0381-08

岩石内生菌是指生活在岩石内部孔隙中的细菌、真菌及真核藻类等^[1], 广泛存在于石灰石、砂岩、大理石、白云石、石膏、花岗岩和岩石漆等各类岩石中^[2, 3], 具有抗紫外、耐高温、耐干旱、分化岩石、土壤定植、加速矿物元素溶解及循环和氧化金属离子等功能, 是无植被覆盖的极端干旱区主要初级生产者^[4-7]。

免培养结果表明, 美国洛基山花岗岩内生细菌优势类群为放线菌门和厚壁菌门^[2], 南极砂岩为蓝细菌门和苔藓^[8], 南非石膏主要由黄杆菌纲、放线菌纲、 α 及 γ -变形菌纲和异常球菌纲构成^[9]。采用

可培养法, 从加利福尼亚 Whipple 岩石漆中分离到抗紫外细菌^[4], 此外在美国新墨西哥州黑峡谷岩石漆发现很多具有氧化铁、锰的功能细菌^[10]。国内此类研究未见报道。

岩石是新疆特殊生境的重要组成部分之一, 阐明其内生菌群落组成及多样性具有重要的生态学和地质学意义。末端限制性片段长度多态性分析 (Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 技术具有高分辨率和可重复性的特点, 已广泛应用于揭示不同环境微生物群落结构和组成^[11]。因此本文采集不同环境及类型的乌苏花岗岩、一号

基金项目: 新疆特殊环境微生物重点实验室开放课题 (XJYS0203-2009-06)

* 通信作者。Tel: +86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

作者简介: 牟文婷 (1986-), 女, 新疆人, 硕士, 主要从事特殊生境环境微生物的研究。E-mail: musiyang_1211@163.com

收稿日期: 2011-11-30; 修回日期: 2012-02-07

冰川和木垒变质岩、裕民和托克逊岩石漆样品,利用 T-RFLP 技术,分析其内生细菌群落组成及多样性,为菌种资源挖掘奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集处地貌:乌苏(84°62'E,44°45'N)属半干旱大陆性气候,年日照 2600 h,年积温 3600℃,最低气温为 -37.5℃,最高气温为 42.2℃,年均气温 7.3℃,年均降水 158 mm;一号冰川(86°49'E,43°06'N)该地区负温月长达 7-8 个月,最冷月平均气温 -15.6℃,最热月(7月)为 4.9℃。年平均气温为 -5.2℃,年平均降水量 441.1 mm;木垒(91°42'E,44°37'N)属温带亚干旱气候区,最高气温 36.9℃,最低气温 -31.8℃。年积温 2567℃,年均气温 5.0℃,年均降水量 292.6 mm;裕民(82°12'E,45°24'N)属温带大陆性气候,年日照 3122.6 h,年均气温 6.7℃,年均降水量 280 mm;托克逊(88°63'E,42°77'N)属暖温带干旱荒漠气候,最高气温为 48℃,年日照 2939.3 h,年均积温 5600℃,年均气温 13.8℃,年均降水 7 mm。

1.1.2 样品采集:各样品采集地随机选取 5 个采样点,用 75% 乙醇擦拭菌子和铁锤,取岩石表面下 3-5 cm 的岩石样品,获取碎屑^[12]。同一采集地的样品在实验室经研磨、混匀后进行环境样品总 DNA 的提取,剩余岩石样品长期保存于 -70℃ 冰箱。

1.1.3 主要仪器和试剂:PCR 引物、PCR 操作试剂和酶均购自上海生物工程公司,PCR 仪为 Eppendorf AG 22331 Hamburg;凝胶成像系统为 GK-330C。

1.1.4 岩石样品总 DNA 的提取与纯化:将岩石样品于超净台紫外线表面灭菌,研磨至粉末状,采用玻璃珠-SDS 结合法提取总 DNA^[2],用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测并用 DNA 纯化试剂盒纯化。

1.1.5 细菌 16S rRNA 基因扩增:选用细菌通用引物 8F 和 1492R^[13]对样品 16S rRNA 基因序列进行扩增,正向引物 8F 序列为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'(5'为 FAM 标记),反向引物 1492R 序列为 5'-TACGGTTACCTGTGTTACGACTT-3';PCR 扩增体系: Takara loading dye mix 12.5 μL,上下游引物(10/pm)

0.5 μL,模板 1 μL,Taq polymerase 0.1 μL,加入无菌去离子水至 25 μL;PCR 反应条件:95℃ 5 min;95℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min 30 s,30 个循环;72℃ 7 min。各样品设置 4 个平行样,混合均匀后进行酶切。

1.1.6 细菌 T-RFLP 分析:选择 *Hha* I 和 *Msp* I 两种限制性内切酶对混合后的 PCR 产物进行酶切。*Hha* I 和 *Msp* I 酶切条件为 37℃ 酶切 9 h,酶切完毕后 80℃ 水浴 20 min 终止反应。酶切产物送上海基康生物技术有限公司检测。

1.1.7 样品 T-RFs 筛选及多样性指数计算:选择末端限制性片段(Terminal restriction fragments T-RFs)在 50-600 bp 范围内、荧光强度高于 100U 且 T-RFs 的峰面积大于总峰面积 0.5% (小于 0.5% 被视为噪音值)的片段进行香依指数(Shannon index H)、辛普森指数(Simpson index D)和均匀度指数(Eveness index E),分析石内生细菌群落结构多样性。其中 $H = -\sum p_i \ln p_i^2$, $D = 1 / \sum P_i$, $E = H / \ln S$, P_i 代表片段所占的相对面积^[13]。

1.1.8 样品相似性指数计算及聚类分析:采用公式 $C_s = 2N_{AB} / (N_A + N_B)$ 计算 Sorensen 相似性指数, N_{AB} 代表共有的 T-RFs, N_A 、 N_B 为各自 T-RFs^[14]。采用 SPSS 软件层次聚类分析工具,通过平方欧式距离和组间聚类方法对样品进行聚类^[15]。

1.1.9 细菌优势种属比对:利用 MiCA PAT⁺ 工具(<http://mica.ibest.uidaho.edu/>)在线分析各 TRFs 片段所代表的微生物种类,并挑出 *Hha* I 和 *Msp* I 酶切所产生的共有种属,峰面积所占比例大于 4% 的种属作为样品优势菌^[16]。

2 结果和分析

2.1 细菌 T-RFLP 图谱及多样性分析

根据 *Hha* I 和 *Msp* I 酶切 T-RFLP 图谱(图 1)中 T-RFs 数目及相对峰高和峰面积值,分别计算了 5 个样品 Shannon-weiner 指数(H'), Simpson 指数(D)、均匀度指数(E)(表 1)。结果显示,同为变质岩,但 3 号样(木垒)各指数稍高于 2 号样品(一号冰川);4 号样(裕民岩石漆)略高于 5 号样品(托克逊岩石漆)。各样品间多样性指数总体变化不大。酶切图谱和多样性指数结果均显示,*Hha* I 酶切样品微生物多样性略高于 *Msp* I 酶切,故后续分析采用 *Hha* I 酶切结果。

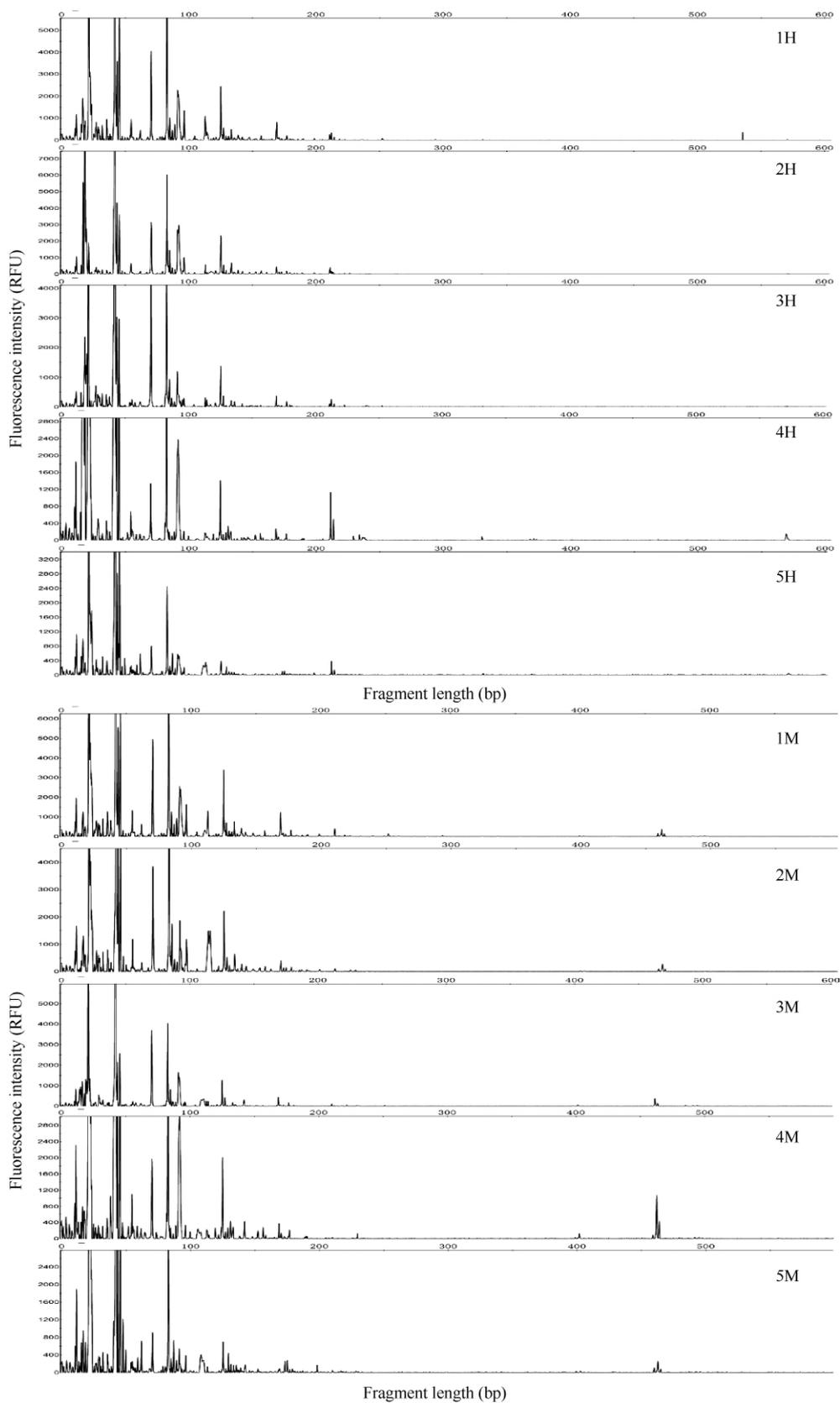


图 1 细菌群落 T-RFLP 图谱分析

Fig. 1 T-RFLP profile of bacterial Community. Numbers 1-5 mean sample 1-sample 5. H and M are different restriction endonuclease, *Hha* and *Msp*.

表 1 细菌群落多样性分析

Table 1 Diversity analysis of bacterial community

Sample	Hha I				Msp I			
	T-RFs (S)	Shannon-Weiner index (H')	Simpson index (D)	Evenness index (E)	T-RFs (S)	Shannon-Weiner index (H')	Simpson index (D)	Evenness index (E)
sample1	25	2.33	0.85	0.72	27	2.18	0.81	0.70
sample2	30	2.32	0.83	0.70	26	2.06	0.8	0.71
sample3	31	2.51	0.87	0.71	26	2.41	0.88	0.64
sample4	35	2.61	0.89	0.70	30	1.95	0.62	0.67
sample5	29	2.37	0.82	0.71	25	2.32	0.72	0.88

2.2 样品间相似性及聚类分析

聚类分析能够反映样品间微生物群落的相似性 2 号样和 3 号样聚为一支并与 1 号样再聚

为一支(图 2) 4 号样与 5 号样聚为一支;表明不同生境下的同种岩石类型,其细菌群落相似性较高。

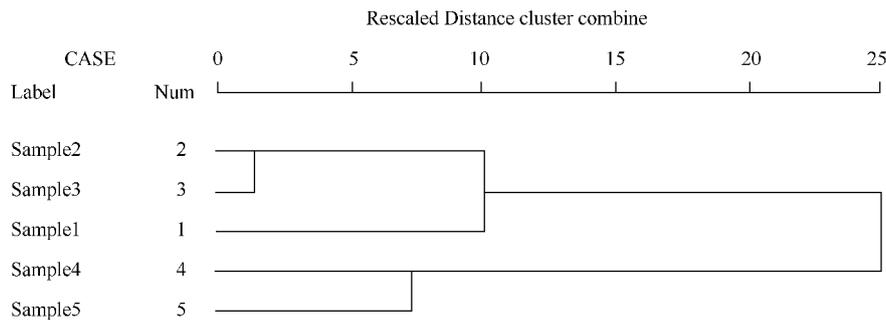


图 2 细菌群落聚类分析

Fig. 2 Dendrogram of the hierarchical clustering analysis of bacterial community.

2.3 优势菌群分析

根据 Hha I 和 Msp I 酶切 T-RFLP 图谱中的优势片段,筛选出各样品中的类群组成(图 3)及优势种属(表 2)。5 个样品共有种群为厚壁菌门

(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、变形菌门(Proteobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。1 号和 2 号样特有种群分别为酸杆菌门(Acidobacteria)和浮霉菌门(Planctomycetes)。

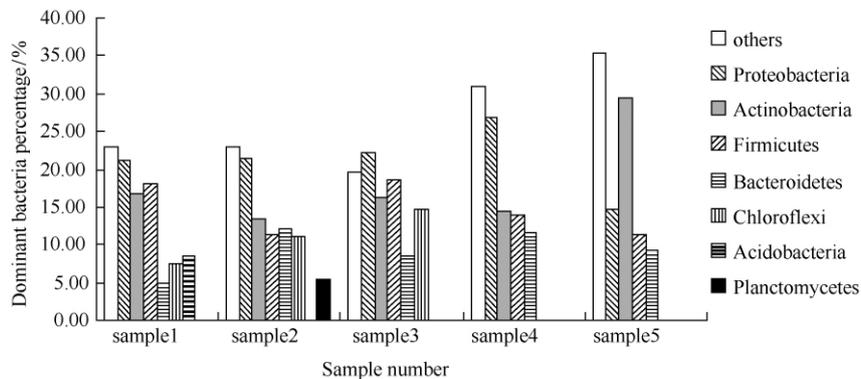


图 3 不同样品细菌组成

Fig. 3 The phylogenetic groups in the different samples.

1 - 5 号样品优势种属分别为变形菌门 Pseudomonas (21.2%)、放线菌门 Micrococcus

(13.4%)、厚壁菌门 Bacillus (18.7%),厚壁菌门 Bacillus (14.0%)和放线菌门 Arthrobacter (16.3%)。

表 2 优势细菌 MiCA 种属比对
Table 2 The dominant bacterial identified by MiCA

Sample	Hha I observed	Msp I observed	Area /%	Accession	Similar group	Phylum
sample 1	210.74	147.77	6.7	EF592490	<i>Bacillus</i>	
	61.74	88.88	6.1	EF452662	<i>Paenibacillus</i>	Firmicutes
	176.96	129.23	5.3	EU131161	<i>Acetobacter</i>	
	61.74	462.81	21.2	AM411057	<i>Pseudomonas</i>	Proteobacteria
	179.02	142.27	16.9	HQ327127	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
	96.31	141.81	8.5	FJ529274	<i>Acidobacterium</i>	Acidobacteria
	91.08	138.71	7.6	FJ481334	<i>Chloroflexus</i>	Chloroflexi
	104.47	96.42	4.8	AB470321	<i>Bacteroides</i>	Bacteroidetes
sample 2	156.76	82.74	6.7	EF620446	<i>Azotobacter</i>	
	61.73	127.2	6.3	D14510	<i>Rhizobium</i>	Proteobacteria
	84.86	152.56	8.4	HQ717396	<i>Sphingomonas</i>	
	61.73	147.65	7.2	AB043863	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	212.06	138.71	4.2	AY382189	<i>Paenibacillus</i>	
	112.9	163.77	13.4	DQ923132	<i>Micrococcus</i>	Actinobacteria
	91.89	86.81	12.1	EU373307	<i>Cytophaga</i>	Bacteroidetes
	91.89	138.71	11.2	FJ481260	<i>Chloroflexus</i>	Chloroflexi
	82.81	114.25	5.5	FJ542891	<i>Planctomyces</i>	Planctomycetes
	sample3	61.83	462.74	12.1	AM411057	<i>Pseudomonas</i>
61.73		125.21	5.3	EF101308	<i>Rhizobium</i>	Proteobacteria
91.08		86.86	4.7	AM110991	<i>Flavobacterium</i>	
112.9		163.77	16.3	HM222656	<i>Micrococcus</i>	Actinobacteria
70.32		125.21	14.7	HQ397030	<i>Chloroflexus</i>	Chloroflexi
61.83		81.72	18.7	AB098576	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
91		86.63	8.6	EU373337	<i>Cytophaga</i>	Bacteroidetes
sample4		61.69	129.41	11.8	FJ529292	<i>Rhodobacter</i>
	81.73	402.53	9.6	AB097175	<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria
	570.97	142.27	5.4	AB196247	<i>Burkholderia</i>	
	78.74	142.36	9.5	EU266494	<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
	173.2	138.91	5.0	EU181235	<i>Rhodococcus</i>	
	211.99	82.85	14.0	EU685825	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	96.29	91.75	11.7	AB470321	<i>Bacteroides</i>	Bacteroidetes
sample5	61.8	80.41	16.3	HQ834307	<i>Arthrobacter</i>	
	173.2	138.91	8.4	EU181235	<i>Rhodococcus</i>	Actinobacteria
	142.12	125.21	4.6	HQ530520	<i>Microbacterium</i>	
	84.89	152.34	14.6	HQ717396	<i>Sphingomonas</i>	Proteobacteria
	78.74	142.36	11.3	AB098576	<i>Bacillus</i>	Firmicutes
	95.09	91.05	9.4	AY643081	<i>Bacteroides</i>	Bacteroidetes

3 讨论

同为花岗岩内生细菌,乌苏的优势类群为变形菌门(21.2%)和厚壁菌门(18.1%),美国犹他州的为变形菌门(54.5%)和厚壁菌门(27.3%)^[17],两者结果类似;而美国南洛基山的为放线菌门(41%),厚壁菌门仅为9%^[2],这可能与环境因子及岩石理化因素有关,紫外辐射、透光性和导热性造成岩石内部光照波长和温度差异,从而影响岩石内生

菌的分布及群落结构^[18-19]。此外降雨量、岩石渗透率及元素组成也可影响微生物多样性和丰度^[20-21]。

目前对变质岩内生细菌群落组成的研究未见报道。一号冰川和木垒变质岩的优势类群均为变形菌门,分别占整个细菌种群的21.4%和22.1%,但种属不同,一号冰川为*Azotobacter*,*Rhizobium*和*Sphingomonas*,木垒为*Pseudomonas*,*Rhizobium*和*Flavobacterium*,但在南极石膏、Mojave沙漠石膏及柬埔寨砂岩也发现了变形菌门的上述种属^[3,22-23]。一号冰川变质岩中存在浮霉菌门的*Planctomyces*,在

南极石英石内也有该属^[24]。另外,一号冰川和木垒变质岩均含有绿弯菌门的 *Chloroflexus*,其能产生胞外物质,而变形菌门的 *Flavobacterium* 则可以降解其胞外产物^[9]。

同为岩石漆,裕民的优势类群为变形菌门(24.5%),美国墨西哥州黑峡谷的为蓝细菌门(62%)^[10],而托克逊及加利福尼亚 Whipple 均为放线菌门,分别为 29.3%和 82.2%^[25]。此差异可能是由于气候差异导致岩石漆内各元素所占比例不同,从而影响微生物群落组成,湿润及高 pH 条件下,外界 Mn 元素沉降量增加,而 Fe、Al 和 Si 元素减少,Mn 元素的氧化进入了相对活跃的时期^[10 26],相关研究表明,厚壁菌门的 *Bacillus* 能够将 Mn^{2+} 氧化为 Mn^{4+} ^[10 27]。干旱及低 pH 条件下,情况反之,Mn 元素沉降量减少,而 Fe、Al 和 Si 元素增加,且放线菌门的 *Arthrobacter* 可加速岩石中 Fe^{2+} 的释放^[5]。此外,裕民岩石漆中未发现蓝细菌,但存在含色素的光和细菌 *Rhodobacter* 能够为其它微生物提供营养^[9]。

对 5 个样品进行聚类分析发现,不同生境的相同类型岩石内生细菌群落相似性较高,这与 Jeffrey J. 等人的对美国落基山砂岩的研究结果一致,其发现美国落基山砂岩与南极砂岩微生物组成较为相似^[2];花岗岩与变质岩聚为一支,这可能是由于他们在形成过程中较为相似^[28]。

特别值得注意的是,所有岩石样品内生细菌均存在大量未知种属的片段,分别占到各样品总细菌种群的 22.9% - 35.4%,可能原因是 MiCA 数据库不完善或存在大量未知细菌新种资源^[2 8 24],因此后续研究将结合克隆文库的方法进一步揭示岩石内生菌的组成与结构。

参考文献

- [1] Wong FKY , Lau MCY , Lacap DC , Aitchison JC , Cowan DA , Pointing SB. Endolithic Microbial Colonization of Limestone in a High-altitude Arid Environment. *Microbial Ecology* , 2010 , 59 (4) : 689-699.
- [2] Walker JJ , Pace NR. Phylogenetic Composition of Rocky Mountain Endolithic Microbial Ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* , 2007 , 73 (11) : 3497-3504.
- [3] Dong HL , Rech JA , Jiang HC , Sun H , Buck BJ. Endolithic cyanobacteria in soil gypsum: Occurrences in Atacama (Chile) , Mojave (United States) , and Al-Jafr Basin (Jordan) Deserts. *Journal of Geophysical Research* , doi:10.1029/2006JG000385.
- [4] Kuhlman KR , Allenbach LB , Ball CL , Fusco WG , LaDuc MT , Kuhlman GM , Anderson RC , Stuecker T , Erickson IK , Benardini J , Crawford RL. Enumeration , isolation , and characterization of ultraviolet (UV-C) resistant bacteria from rock varnish in the Whipple Mountains , California. *Elsevier* , 2011 , 174 (2) : 401-411.
- [5] Frey B , Rieder SR , Brunner I , Plötze M , Koetzsch S , Lapanje A , Brandl H , Furre G. Weathering-Associated Bacteria from the Damma Glacier Forefield: Physiological Capabilities and Impact on Granite Dissolution. *Applied and Environmental Microbiology* , 2010 , 76 (14) : 4788-4796.
- [6] Ehrlich HL. Geomicrobiology: its significance for geology. *Earth-Science Reviews* , 1998 , 45 (1-2) : 45-60.
- [7] Friedmann EI , Ocampo R. Endolithic blue-green algae in dry valleys-primary producers in Antarctic desert ecosystem. *Science* , 1976 , 193 (4259) : 1247-1249.
- [8] Torre JR , Goebel BM , Friedmann EI , Pace NR. Microbial Diversity of Cryptoendolithic Communities from the McMurdo Dry Valleys , Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology* , 2003 , 69 (7) : 3858-3867.
- [9] Stivaletta N , López-García P , Boiher L , Millie DF , Barbieri R. Biomarkers of Endolithic Communities within Gypsum Crusts (Southern Tunisia). *Geomicrobiology journal* , 2010 , 27 (1) : 101-110.
- [10] Northup DE , Snider JR , Spilde MN , Porter ML , Kamp JL , Boston PJ , Nyberg AM , Bargar JR. Diversity of rock varnish bacterial communities from Black Canyon , New Mexico. *Journal of Geophysical Research* , doi:10.1029/2009JG001107.
- [11] Schütte UM , Abdo Z , Bent SJ , Shyu C , Williams CJ , Pierson JD , Forney LJ. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* , 2008 , 80 (3) : 365-380.
- [12] Wong FY , Lau MC , Lacap DC , Aitchison JC , Cowan DA , Pointing SB. Endolithic Microbial Colonization of Limestone in a High-altitude Arid Environment. *Microbial Ecology* , 2010 , 59 (4) : 689-699.
- [13] Blackwood BC , Hudleston D , Zak DR , Buyer JS. Interpreting Ecological Diversity Indices Applied to Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Data: Insights from Simulated Microbial Communities. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2007 , 73 (16) : 5276-5283.

- [14] Ridwan R , Widyastuti Y , Budiarti S , Dinoto A. Analysis of Rumen Microbial Population of Cattle Given Silage and Probiotics Using Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism. *Microbiology* , 2009 , 3 (3) : 126-132.
- [15] Dang HY , Li J , Chen MN , Li TG , Zeng ZG , Yin XB. Fine-scale vertical distribution of bacteria in the East Pacific deep-sea sediments determined via 16S rRNA gene T-RFLP and clone library analyses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 2009 , 25 (2) : 179-188.
- [16] Ringelberg DB , Foley KL , Reynolds CM. Electrogenic capacity and community composition of anodic biofilms in soil-based bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 2011 , 90 (5) : 1805-1815.
- [17] Kan J. Chellamuthu P , Obraztsova A , Moore JE , Neelson KH. Diverse bacterial groups are associated with corrosive lesions at a Granite Mountain Record Vault (GMRV). *Journal of Applied Microbiology* , 2011 , 111 (2) : 329-337.
- [18] Hall K , Guglielmin M , Strini A. Weathering of granite in Antarctica: I. Light penetration into rock and implications for rock weathering and endolithic communities. *Earth Surface Processes and Landforms* , 2008 , 33 (2) : 295-307.
- [19] Hall K. Natural building stone composed of light-transmissive minerals: impacts on thermal gradients , weathering and microbial colonization. A preliminary study , tentative interpretations , and future directions. *Environmental earth sciences* , 2011 , 62 (2) : 289-297.
- [20] Warren-Rhodes KA , Rhodes KL , Pointing SP , Ewing SA , Lacap DC , Amundson R , Friedmann EI , McKay CP. Hypolithic Cyanobacteria , Dry Limit of Photosynthesis , and Microbial Ecology in the Hyperarid Atacama Desert. *Microbial Ecology* , 2006 , 52 (3) : 389-398.
- [21] McNamara CJ , Perry IV TD , Bearce KA , Hernandez-Duque G , Mitchell R. Epilithic and Endolithic Bacterial Communities in Limestone from a Maya Archaeological Site. *Microbial Ecology* , 2006 , 51 (1) : 51-64.
- [22] Hughes KA , Lawley B. A novel Antarctic microbial endolithic community within gypsum crusts. *Environmental Microbiology* , 2003 , 5 (7) : 555-565.
- [23] Lan WS , Li H , Wang WD , Katayama Y , Gu JD. Microbial Community Analysis of Fresh and Old Microbial Biofilms on Bayon Temple Sandstone of Angkor Thom , Cambodia. *Microbial Ecology* , 2010 , 60 (1) : 105-115.
- [24] Pointing SB , Chan YK , Lacap DC , Lau MCY , Jurgens JA , Farrell RL. Highly specialized microbial diversity in hyper-arid polar desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 2009 , 106 (47) : 19964-19969.
- [25] Kuhlman KR , Fusco WG , Laduc MT , Allenbach LB , Ball CL , Kuhlman GM , Anderson RC , Erickson IK , Stuecker T , Benardini J , Strap JL , Crawford RL. Diversity of Microorganisms within Rock Varnish in the Whipple Mountains , California. *Applied and Environmental Microbiology* , 2006 , 72 (2) : 1708-1715.
- [26] 傅海荣 , 刘耕年 , 魏遐 , 张小咏. 天山高山冰缘环境中岩石漆的形貌、成分和成因分析. 干旱区地理 (*Arid Land Geography*) , 2005 , 28 (4) : 429-434.
- [27] Hungate B , Danin A , Pellerin NB , Stemmler J , Kjellander P , Adams JB , Staley JT. Characterization of manganese-oxidizing (MnII \rightarrow MnIV) bacteria from Negev Desert rock varnish: implications in desert varnish formation. *Canadian Journal of Microbiology* , 1987 , 33 (10) : 939-943.
- [28] 张琴. 地质学基础. 北京: 石油工业出版社, 2008 , 63-88.

Terminal restriction fragment length polymorphism analysis of endolithic bacteria community at special habitats in Xinjiang

Wenting Mu¹, Tao Zhang², Jian Sun², Jun Zeng², YingHua Xu², Zunfeng Wu², Wen Hu², Kai Lou^{2*}

¹ College of Life Science and Technology of Xinjiang University, Urumqi 830046, China

² Institutes of Microbiology, Xinjiang Academy of Agriculture Science, Urumqi 830091, China

Abstract: [Objective] In order to investigate the composition and diversity of endolithic bacteria at special habitats in Xinjiang. [Methods] Five rock samples were collected, including Wusu's granite (sample 1), Glacier No. 1, and Mulei's metamorphic rock (sample 2, sample 3), Yumin and Tokesun's Rock varnish (sample 4, sample 5). Endolithic bacterial community composition and diversity were analyzed by the method of Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism. [Results] Differences in diversity indexes among samples were not apparent. Clustering analysis suggested that similarity coefficient was higher in same rock type, sample 2 and sample 3 were grouped together, then sample 1 clustered with them, and sample 4 and sample 5 were classified together. All samples harbored these phyla such as Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria and Bacteroidetes. Acidobacteria and Planctomycetes existed in sample 1 and sample 2, respectively; Sample 5 was dominated by Actinobacteria, while other samples were dominated by Proteobacteria. [Conclusion] The endolithic bacterial composition of same rock type collected at various habitats was different. Meanwhile, a diversity of novel species and lineages maybe existed in rocks.

Keywords: endolithic bacteria, T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), diversity

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Open Project of the Key Lab of Microorganisms in Xinjiang Specific Environment(XJYS0203-2009-06)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

Received: 30 November 2011/Revised: 7 February 2012

系统发育树的构建方法

构建系统树是为了鉴定菌株的分类学地位,应该使用正确的方法构建。具体要求如下:

1. 将鉴定菌的 16S rRNA 序列递交 GenBank,用 Blast 软件搜索相似的 16S rRNA,然后一起构树。
2. 采用能反应分支长度的软件(如 NJ 法),并用 Bootstrap 值分析分支聚类的稳定性。
3. 用国际较为通用的一些建树方法,如 Neighbour - Joining 等,这样结果就更为可靠,更直观。
4. 请严格按照下列具体要求写作[参见:微生物学报,2004,44(2):143.]

① 系统树中:菌名应列出全称,且属和种名应斜体,名称后再加括号,其内含序列号。

② 图注(本刊的图注要求用英文写作):应表明"树"上所有的内容,包括:括号中的序号、分支点上的数字涵义、0.01 代表的意义。

③ 作图要求:要求达到印刷清晰,字体为"Time New Roman",字号为"8p"。可以选用两种方式——(A)文件格式为"* . Tif",分辨率为 600 线;(B)文件格式为"word",画出树,输入文字。