

新疆两湖细菌的非培多样性研究

孙超, 吴敏*, 史锋*

(浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310058)

摘要:采用非培的方法对新疆销库尔咸湖和兔子湖的细菌多样性进行研究,通过细菌的 16S rDNA 通用引物 PCR 扩增其 16S rRNA 基因序列并构建 16S rDNA 文库,每个湖随机抽取 32 个克隆子进行测序,借助系统发育分析软件对获得的序列进行分析;同时通过多样性指数、丰富度指数和优势度指数对两个湖的细菌多样性进行了比较分析. 研究结果表明同销库尔咸湖的细菌文库相似的微生物属于以下六大细菌类群:变形细菌门(Proteobacteria)34.5%,包括 α -proteobacteria、 β -proteobacteria 和 γ -proteobacteria 三个纲,拟杆菌门(Bacteroidetes)27.6%,壁厚菌门(Firmicutes)24.1%,绿菌门(Chlorobi)3.4%,疣微菌门(Verrucomicrobia)3.4%和未分类细菌(unclassified)6.9%;而与兔子湖的细菌文库相似的微生物则分为以下七大类:变形细菌门(Proteobacteria)51.90%,包括 β -proteobacteria、 γ -proteobacteria 和 δ -proteobacteria,拟杆菌门(Bacteroidetes)7.40%、壁厚菌门(Firmicutes)22.2%、酸杆菌门(Acidobacteria)3.70%、放线菌门(Actinobacteria)3.70%、浮霉菌门(Planctomycetes)3.70%和未分类细菌(Unclassified)7.40%. 最后两湖的各种多样性指数的比较结果表明兔子湖的细菌多样性和丰富度均比销库尔咸湖大,这也充分显示了新疆地区的湖泊具有丰富的微生物多样性,值得进一步深入研究.

关键词:新疆; 16S rDNA 文库; 系统发育分析; 多样性

中图分类号:Q93

文献标识码:A

文章编号:1008-9497(2008)04-448-07

SUN Chao¹, WU Min, SHI Feng (College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)**Molecular analysis of bacterial diversity with the two lakes in Xinjiang.** Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2008, 35(4): 448~454

Abstract: The bacterial diversity of Xiaokuer Lake and Tuzi Lake located in Xinjiang was investigated through a culture-independent approach by constructing 16S rDNA clone libraries whose 16S rDNA was proliferated by PCR using bacterial universal primers. For the bacterial rDNA clone libraries, 32 clones randomly selected in each lake was sequenced for phylogenetic analysis. The comparative analysis of bacterial diversity on the two lakes was made as well by several diversity index including Shannon-Weaver diversity index, Simpson dominance index, Chao and ACE richness estimation. The result showed that the bacteria of Xiaokuer Lake consists of Proteobacteria (34.5%), Bacteroidetes (27.6%), Firmicutes (24.1%), Chlorobi (3.4%), Verrucomicrobia (3.4%) and unclassified (6.9%). In the case of the bacteria of Tuzi Lake, seven major phyla were detected including Proteobacteria (51.9%), Bacteroidetes (7.4%), Firmicutes (22.2%), Acidobacteria (3.7%), Actinobacteria (3.7%), Planctomycetes (3.7%) and unclassified (7.4%). It is concluded that the bacteria of the Tuzi Lake is more diverse and rich than that of the Xiaokuer Lake by several diversity index. At last it demonstrated that lakes within Xinjiang harbor have quite diverse microorganism and are worth of further investigation.

Key words: Xinjiang; 16S rDNA clone library; phylogenetic analysis; diversity

新疆境内大于 1 km² 以上的湖泊约 200 个,在这些湖泊中湖水含盐量达到 50 g · L⁻¹ 以上或出现盐类沉积,即已经或接近演化到盐湖阶段的湖泊有 100 多个^[1]. 正是由于新疆地区盐湖众多,蕴含着各种独特而

丰富的微生物资源,因而近年来国内微生物方向的科研人员分别对新疆地区艾比盐湖^[2-4]和艾丁盐湖^[2,4]、伊吾湖^[3]和达坂城盐湖^[4]等盐湖进行了较为深入的研究,而对文中的研究对象——销库尔咸湖和兔子湖的

收稿日期:2007-03-15.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30670048).

作者简介:孙超(1983-),男,硕士,主要从事微生物分子生态学.

* 通讯作者.

微生物多样性还缺乏最基本的认识,并且前人对上述这些盐湖的研究更侧重通过可培养的方式来分离获得嗜盐古菌,而忽视了对微生物界另一大类细菌的研究。

同时随着分子生物学技术和生物信息学的进步,基于 16S rDNA 序列的非培养技术已成为近年来研究自然界微生物种类和遗传多样性的一种新型的分析手段^[5]。这种方法已经被广泛应用到土壤^[6]、海洋^[7,15]、温泉^[8]、盐湖^[9]等环境的微生物多样性研究中,并发现了多种新的细菌与古菌类群^[8,10]。因此本文着重利用非培养技术直接获得并分析销库尔咸湖和兔子湖的 16S rDNA 序列,研究湖中细菌类微生物的多样性,并对两湖之间进行了比较分析。本项研究将丰富我们对新疆盐湖微生物多样性的认识,同时将为进一步深入开发和利用该湖的微生物资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

FastDNA[®] SPIN Kit for Soil 购自 Qiogene 公司, FastPrep[®] 核酸快速提取仪 (BIO 101[®] Systems 公司), Taq DNA 聚合酶购自天为公司, pMD-18-T-Vector 购自 TaKaRa 公司。

1.2 样品的采集和处理

销库尔咸湖位于东经 90°09'、北纬 37°08'。兔子湖位于东经 87°16.969'、北纬 36°38.976', 海拔高度为 4 876 m, 于 2005 年 12 月采集湖泊的土样, 样品采集后 4℃ 保存。

1.3 总 DNA 的提取和纯化

使用 FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (Bio101) 直接从土样中提取和纯化总 DNA, 操作流程严格按照操作手册进行。称 0.5~1 g 的土样置于试管中(含灭菌处理的各种型号的玻璃珠), 接着加 978 μL 磷酸盐缓冲液和 122 μL MT 缓冲液, 用漩涡振荡器振荡混匀, 放到 FastPrep[®] 核酸快速提取仪中处理 30 s, 14 000 ×g 离心 30 s 后取上清, 加 250 μL PPS 至上清液中反复颠倒几次混匀, 14 000 ×g 离心 5 min 后取上清液至 15 mL 经灭菌处理过的离心管, 添加 1 mL Binding Matrix Suspension 反复颠倒混匀持续 2 min, 然后静置 3 min, 去除 500 mL 上清液, 然后将剩余液体混匀并转移至 SPIN[™] Filter, 14 000 ×g 离心 1 min, 然后加 500 μL 清洗液 SEWS-M 到 SPIN[™] Filter 14 000 ×g 离心 1 min, 去除滤液, 接着 14 000 ×g 离心 2 min 干燥沉淀, 室温干燥 5 min, 然后将 SPIN[™] Filter 转移至新的离心管中, 添加 50 μL DES 并混匀将 DNA 充分洗脱下来, 14 000 ×g 离心 2 min, 收集到的滤液即为含有样品 DNA。

1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增

细菌通用引物 B1 和 B4, PCR 反应体系为 50 μL, 包括 5 μL 10 × Buffer (含 2 mmol · L⁻¹ MgCl₂), 0.5 μL 0.2 mmol · L⁻¹ dNTPs, 4 pM 的 B1 (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 B4 ((5'-ACGGHTACCTTGTTACGACTT-3') 细菌通用引物各 1 μL, 100 ng DNA 模板量, 2.5 U TaqDNA 聚合酶, 其余用灭过菌的双蒸水补足。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 45 s, 50 °C 45 s, 72 °C 1 min 15 s, 32 个循环; 72 °C 10 min; 最后至 4 °C。

1.5 16S rDNA 文库的构建

PCR 扩增产物通过琼脂糖电泳胶回收, 使用回收试剂盒 (Qiogene 公司), 接着将回收的 PCR 扩增产物在 16 °C 条件下和 T 载体 pMD-18-T-Vector (TakaRa 公司) 连接过夜; 连接产物转入感受态细胞 *E. coli* TOP10; 将转化后的菌液涂至 LB (含 Amp 100 μg · mL⁻¹) 平板, 37 °C 过夜静置培养。

1.6 测序和系统进化分析

随机从转化子中挑取 32 个克隆子进行测序, 测序工作由上海国家人类基因组南方研究中心完成, 测序引物为 B1, 将获得的细菌文库序列输入 Ribosomal Database Project 中 (<http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU>) 用 CHECK-CHIMERA^[11] 程序分析检查, 除去嵌合及怪异序列; 然后将检验过的序列输入 Genbank 以 Blast 程序进行序列相似性比较分析; 采用 Clustal X 1.8 软件进行多序列匹配排列^[12], 使用 PHYLIP (v3.65) 软件的 Neighbor-Joining 算法^[13] 构建系统发育树, 用 Bootstrap 法^[14] 检测所建系统发育树的可信程度, 自展次数设为 1000。文章向 GeneBank 提交的序列登记号 (accession number) 从 EF490072 至 EF490127。

1.7 细菌的多样性分析

定义以 16S rRNA 基因序列相似度大于 95% 作为相同的操作分类单元 (OTU)^[19], 由软件 DOTUR 对序列进行操作分类单元 (OTU) 归类^[20]。采用 Shannon-Weaver 多样性指数、Chao 和 ACE 丰富度指数以及 Simpson 优势度指数进行细菌物种的多样性比较分析。

2 结 果

2.1 16S rDNA 序列比对结果统计

随机挑取的 32 个克隆子测序结果经 chimera-check 分析后, 销库尔咸湖排出 3 个疑似 chimera 后剩下 29 条序列, 兔子湖排除 5 个疑似 chimera 后剩下 27 条序列。将 16S rDNA 克隆序列 (长度取

500bp~600bp)与 GeneBank 数据库上的序列进行相似性比较分析从而得到最相似的序列(表 1 和表 2 分别列出了销库尔咸湖和兔子湖的细菌 16S rDNA

序列与 GeneBank 数据库最相近序列之间的关系),同时由软件 DOTUR 将那些具有高度相似性(相似度 > 95%)的序列划分在同一个分类单元内(OTU)^[19].

表 1 销库尔咸湖 16S rDNA 序列相似性比对结果

Table 1 BLAST result of 16S rDNA sequence from XiaoKuer Lake

OTU 编号	OTU 所含序列数 (Genebank 的序列登记号)	GeneBank 上最相似序列(登记号)	相似度/%
XKE-1	5 (EF490103, EF490121, EF490126, EF490120, EF490112)	Uncultured bacterium clone ANTLV7_C07(DQ521536.1)	98
		Uncultured bacterium clone ANTLV7_C07(DQ521536.1)	98
		Uncultured bacterium clone ANTLV7_C07(DQ521536.1)	98
		Uncultured bacterium clone ANTLV7_A10(DQ521534.1)	99
		<i>Salegentibacter sp.</i> 18III/A01/068(AY576719.1)	97
XKE-2	3 (EF490115, EF490116, EF490100)	<i>Psychrobacter sp.</i> D70(AY309072.1)	100
		<i>Psychrobacter sp.</i> D70(AY309072.1)	100
		<i>Psychrobacter sp.</i> D70(AY309072.1)	100
XKE-3	2 (EF490099, EF490110)	Uncultured alpha proteobacterium clone T31_172(DQ436542.1)	96
		<i>Sulfitobacter sp.</i> BIO-7(AJ532580.1)	99
XKE-4	2 (EF490102, EF490105)	<i>Marinobacter sp.</i> NT N125(AB167040.1)	98
		<i>Marinobacter sp.</i> NT N125(AB167040.1)	98
XKE-5	2 (EF490113, EF490123)	<i>Achromobacter sp.</i> Lm-4(EF025350.1)	99
		<i>Achromobacter sp.</i> Lm-4(EF025350.1)	99
XKE-6	2 (EF490104, EF490125)	Uncultured bacterium clone RH. 209-44-7(DQ662529.1)	98
		Uncultured bacterium clone RH. 208-35-12(DQ662465.1)	97
XKE-7	2 (EF490106, EF490107)	Uncultured bacterium clone SalB15(EF031088.1)	97
		Uncultured bacterium clone SalB15(EF031088.1)	98
XKE-8	2 (EF490117, EF490122)	low G+C Gram-positive bacterium clone (AY542234.1)	92
		low G+C Gram-positive bacterium clone (AY542234.1)	93
XKE-9	1(EF490101)	Uncultured bacterium clone B04P011(AY197415.1)	95
XKE-10	1(EF490108)	Uncultured bacterium clone WM93(DQ415787.1)	98
XKE-11	1(EF490109)	Uncultured Clostridiales bacterium clone 22-3C(EF420224.1)	98
XKE-12	1(EF490111)	Uncultured bacterium clone (AY593456.1)	96
XKE-13	1(EF490114)	Uncultured bacterium clone Pir3bg12(AY354188.1)	90
XKE-14	1(EF490118)	Uncultured bacterium clone Kas152B(EF203197.1)	93
XKE-15	1(EF490119)	Uncultured bacterium clone PMMV-Bac241(AJ937681.1)	99
XKE-16	1(EF490124)	Bacteroidetes bacterium clone WN-FWB-138(DQ432404.1)	93
XKE-17	1(EF490127)	Uncultured bacterium clone Red_61(DQ345690.1)	95

表 2 兔子湖 16S rDNA 序列相似度比对结果

Table 2 BLAST result of 16S rDNA sequence from Tuzi Lake

OTU 编号	OTU 所含序列数 (Genebank 的序列登记号)	GeneBank 上最相似序列(登记号)	相似度/%
TZ-1	5 (EF490076, EF490079 EF490088, EF490074, EF490084)	<i>Thiobacillus Q</i> (AJ289884)	99
		<i>Thiobacillus Q</i> (AJ289884)	99
		<i>Thiobacillus Q</i> (AJ289884)	99
		<i>Thiobacillus Q</i> (AJ289884)	98
		<i>Thiobacillus Q</i> (AJ289884)	95
TZ-2	3 (EF490075, EF490082, EF490094)	<i>Dechloromonas sp.</i> MissR (AF170357)	99
		<i>Aquatic bacterium</i> R1-B23(AB195755)	99
		<i>Aquatic bacterium</i> R1-B23(AB195755)	99
TZ-3	2 (EF490081, EF490089)	<i>Planococcus donghaensis</i> (EF079063)	98
		<i>Planococcus donghaensis</i> (EF079063)	98
TZ-4	1(EF490072)	<i>Actinobacterium ANL-iso2</i> (EF422408)	98
TZ-5	1(EF490073)	Uncultured planctomycete clone(DQ811899)	95
TZ-6	1(EF490077)	<i>Azoarcus sp.</i> GPTSA12(DQ851175)	98

续 表

OTU 编号	OTU 所含序列数 (Genebank 的序列登记号)	GeneBank 上最相似序列(登记号)	相似度/%
TZ-7	1(EF490078)	<i>Gelidibacter</i> sp. QSSC1-21(AF170737)	93
TZ-8	1(EF490080)	<i>Pseudoxanthomonas yeongjuensis</i> (DQ438977)	99
TZ-9	1(EF490083)	<i>Rhodofera x ferrereducens</i> (AM265401)	98
TZ-10	1(EF490085)	Uncultured sulfate-reducing bacterium(AJ389622)	97
TZ-11	1(EF490086)	Uncultured Desulfuromonas sp. Clone(EF205265)	99
TZ-12	1(EF490087)	Uncultured bacterium (AY053483)	88
TZ-13	1(EF490090)	Uncultured Acidobacteria clone(AY921868)	95
TZ-14	1(EF490091)	Uncultured bacterium clone (AM181872)	99
TZ-15	1(EF490092)	Uncultured beta proteobacterium(EF420202.1)	96
TZ-16	1(EF490093)	Uncultured Bacteroidetes bacterium(AY922008)	93
TZ-17	1(EF490095)	Uncultured bacterium clone(AY188316)	94
TZ-18	1(EF490096)	Uncultured bacterium clone(AY327216)	96
TZ-19	1(EF490097)	Uncultured bacterium clone (AJ249095)	93
TZ-20	1(EF490098)	Uncultured bacterium clone(AB273800.1)	95

2.2 系统发育分析结果

2.2.1 销库尔咸湖

根据销库尔咸湖所获得的 16S rDNA 序列构建细菌系统发育树(见图 1). 结果表明销库尔咸湖的细菌微生物可分为六大类:变形细菌门(Proteobac-

teria), 拟杆菌门(Bacteroidetes), 壁厚菌门(Firmicutes), 绿菌门(Chlorobi), 疣微菌门(Verrucomicrobia), 未分类细菌(unclassified). 其中变形细菌门(Proteobacteria)包括 α -proteobacteria、 β -proteobacteria 和 γ -proteobacteria 三个纲.

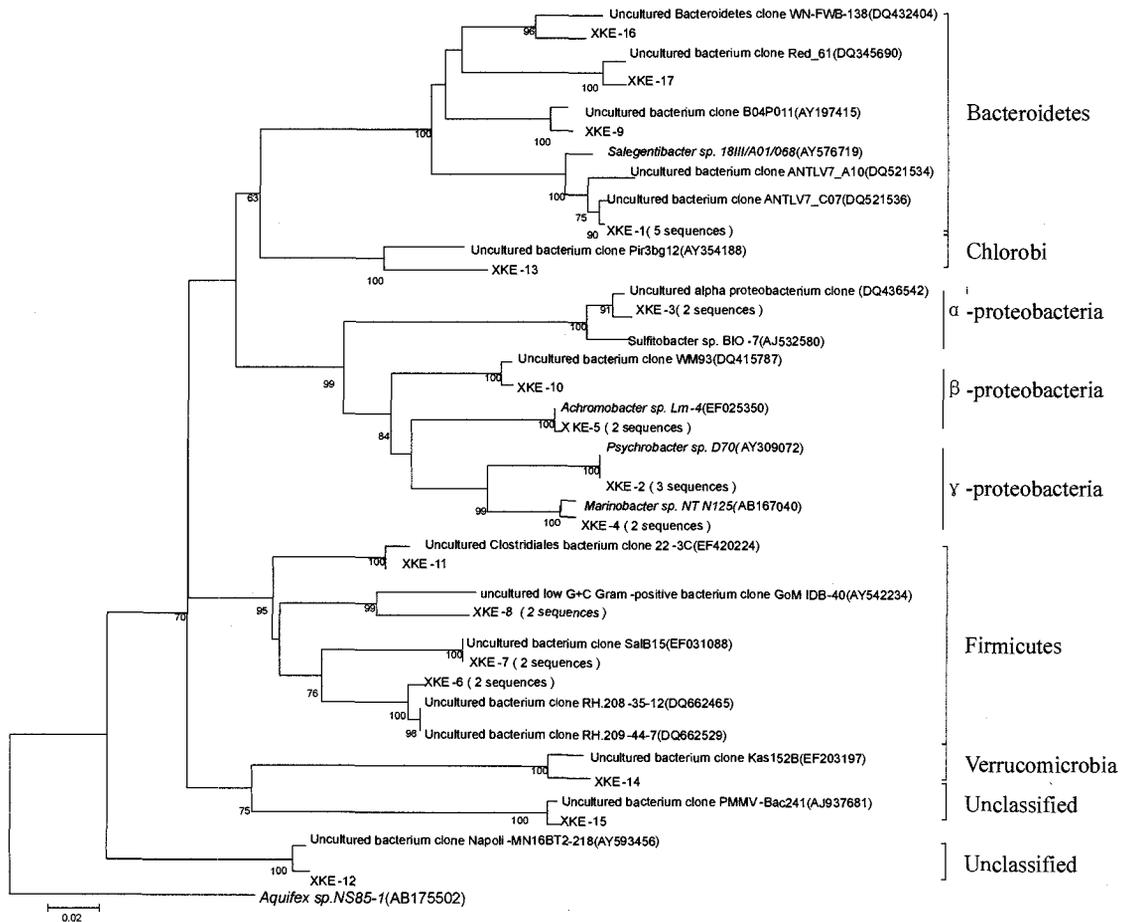


图 1 系统发育树按 Neighbor-Joining 算法和 Jukes-Cantor 模型构建,外群参照为 Aquifex sp. NS85-1 gene for 16S rRNA (AB175502). 自展次数设定为 1000,自展检验结果低于 50 的未显示

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed according to The Neighbor-Joining algorithm and Jukes-Cantor model. Aquifex sp. NS85-1 gene for 16S rRNA(AB175502)is used as outgroup. The times of bootstrap is set up to 1000 and values lower than 50 are not shown

2.2.2 兔子湖

根据兔子湖所获得的 16S rDNA 克隆序列构建细菌系统发育树(见图 2)。结果表明兔子湖的细菌微生物可分为七大类:变形细菌门(Proteobacteria),包括 β -proteobacteria、 γ -proteobacteria 和 δ -

proteobacteria,拟杆菌门(Bacteroidetes)、壁厚菌门(Firmicutes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)和未分类细菌(Unclassified)。

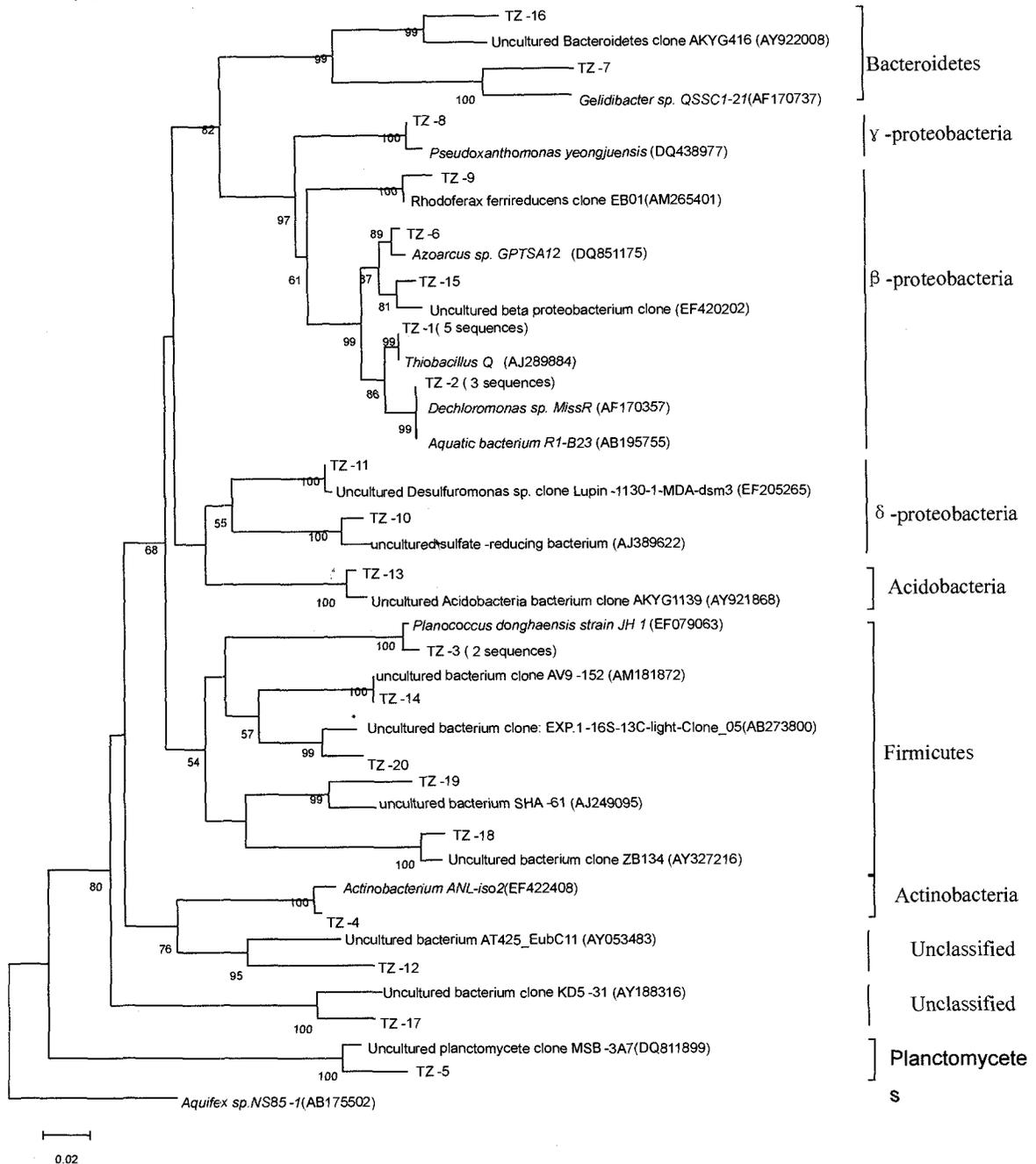


图 2 系统发育树按 Neighbor-Joining 算法和 Jukes-Cantor 模型构建,外群参照为 *Aquifex sp. NS85-1* gene for 16S rRNA (AB175502),自展次数设定为 1000,自展检验结果低于 50 的未显示

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed according to The Neighbor-Joining algorithm and Jukes-Cantor model. *Aquifex sp. NS85-1* gene for 16S rRNA(AB175502)is used as outgroup. The times of bootstrap is set up to 1000 and values lower than 50 are not shown

2.3 两湖细菌多样性的比较分析

先由 PHYLIP 3.65 计算销库尔咸湖 29 条序列和兔子湖 27 条序列的遗传距离矩阵,然后由软件 DOTUR 按照最远距离邻接算法进行操作分类单元

(OTU)分类(见表 3)。多样性计算结果表明(见表 4)兔子湖的细菌多样性指数要比销库尔咸湖稍大,而兔子湖的优势度指数则比销库尔咸湖稍小,同时兔子湖的丰富度指数要远大于销库尔咸湖。

表 3 销库尔咸湖和兔子湖 OTU 分类表

Table 3 OTU List of XiaoKuer and Tuzi Lake

16S rRNA 基因来源	序列 总数	OTU 总数	含 n_x 条序列的 OTU 个数 ^a					
			n_1	n_2	n_3	n_4	n_5	n_6
兔子湖	27	20	17	1	1	0	1	0
销库尔咸湖	29	17	9	6	1	0	1	0

a: n_1 表示单个体种、 n_2 表示双个体种,其它依次类推;遗传距离分界设定值为 0.05

表 4 销库尔咸湖和兔子湖细菌多样性的比较分析

Table 4 Comparative analysis of the bacterial diversity between XiaoKuer and Tuzi Lake

	Chao 丰富 度指数	ACE 丰富 度指数	Shannon-Weaver 多样性指数	Simpson 优势度指数
销库尔咸湖	22.143	26.654	2.689	0.046 8
兔子湖	88.0	106.962	2.824	0.039 9

3 讨 论

通过序列比对结果可以发现,销库尔咸湖有 9 条序列是和通过可培养方式获得的菌株序列最相似,占 31.0%,它们分别是 XKE-1 其中 1 条序列对应 *Salegentibacter sp.* 18III/A01/068 (AY576719.1) 相似度为 97%,XKE-5 的 2 条序列对应 *Achromobacter sp.* Lm-4 (EF025350.1) 相似度均为 99%,XKE-3 其中 1 条序列对应 *Sulfitobacter sp.* BIO-7 (AJ532580.1) 相似度为 99%,XKE-4 的 2 条序列对应 *Marinobacter sp.* NT N125 (AB167040.1) 相似度均为 98%,XKE-2 的 3 条序列对应 *Psychrobacter sp.* D70 (AY309072.1) 相似度均为 100%,分别代表了拟杆菌门 (Bacteroidetes) 下的黄杆菌纲 (Flavobacteria),变形菌门 (Proteobacteria) 下的 β -Proteobacteria 纲, α -Proteobacteria 纲和 γ -Proteobacteria 纲。

兔子湖则有 13 条序列和通过可培养方式获得的菌株序列最相似,占 48.1%,分别为 TZ-1 的 5 条序列对应 *Thiobacillus Q* (AJ289884.1) 相似度为 95%~99%,TZ-2 中 1 条序列对应 *Dechloromonas sp.* MissR (AF170357) 相似度为 99%,另外 2 条序列则对应 *Aquatic bacterium R1-B23* (AB195755) 相似度均为 99%,TZ-3 的 2 条序列对应 *Planococcus donghaensis* (EF079063) 相似度均为 98%,TZ-6 对应 *Azoarcus sp.* GPTSA12 (DQ851175) 相似度为 98%,TZ-7 对应 *Gelidibacter sp.* QSSC1-21 (AF170737) 相似度为 93%,TZ-8 对应 *Pseudoxanthomonas yeo-ningjuensis* (DQ438977) 相似度为 99%,分别代表了

拟杆菌门 (Bacteroidetes) 下的黄杆菌纲 (Flavobacteria),变形菌门 (proteobacteria) 下的 β -proteobacteria 纲、 γ -Proteobacteria 纲,壁厚菌门 (Firmicutes) 下的芽孢杆菌纲 (Bacilli)。上述的变形菌门、拟杆菌门和壁厚菌门普遍存在于一般的盐湖和碱湖,这一点和其他科研人员^[16~18]的研究结果是一致的。

通过对销库尔咸湖细菌 16S rDNA 序列所构建的系统发育树分析可知湖中细菌除了在上述盐湖中较为常见几类外还有绿菌门 (Chlorobi) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia)。结合系统发育树分析可以发现销库尔咸湖的优势菌群主要分为 3 类,分别为变形菌门 (Proteobacteria),拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和壁厚菌门 (Firmicutes),三者之和所占的比例高达 85.8%。另外两个门即绿菌门 (Chlorobi) 和疣微菌门 (Verrucomicrobia) 在其它盐湖中较为少见,其所占比例为 3.6%。此外还有两个尚未确定分类的克隆子 XKE-12 和 XKE-015。

对比销库尔咸湖的细菌系统发育树,兔子湖的细菌系统发育树和它的相同之处在于均有以下三类微生物:变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和壁厚菌门 (Firmicutes),但又有不同的地方,譬如兔子湖中存在着酸杆菌门 (Acidobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、浮霉菌门 (Planctomycetes) 以及 δ -变形菌纲 (δ -Proteobacteria) 的细菌;而销库尔咸湖中则存在着绿菌门 (Chlorobi)、疣微菌门 (Verrucomicrobia) 和 α -变形菌纲 (α -Proteobacteria) 的细菌。这种异同说明新疆不同的盐湖在微生物分布上既有相同之处,又分别具有独自的特色。

在对通过非培方法获得的序列进行物种的操作单元分类 (OTU) 时,分类的标准是一个非常重要的因素同时也是比较有争议的一个指标。一般常用的 OTU 物种定义标准是 97% 的序列相似性 (遗传距离分界值设为 0.03) 97%^[21],有的则设为 99% 的序列相似性 (遗传距离分界值设为 0.01)^[22],还有人则考虑到 PCR 过程中的微小变异而将标准扩大到 95% 的序列相似性^[19],又由于已有科研人员发现单个微生物物种中其 16S rDNA 差异可以达到 95%^[23],本文将操作单元分类 (OTU) 的分界值设定为 95%。同时通过操作单元 (OTU) 来比较两湖细菌的多样性情况时,要通过多种方法来综合评价物种的多样性,因为这样才能有效地避免单一指数评价造成的偏差^[3],这也是本文采用多样性指数、丰富度指数和均匀度指数、优势度指数等多种指数

的原因所在,只有这样得到的结论才可能具有更加的客观性.

总的来说,以细菌 16S rDNA 序列分析的非培养技术和统计学分析两者结合为基础的研究表明新疆的销库尔咸湖和兔子湖中存在着丰富的细菌类群,为研究新疆地区微生物生态系统提供了重要的信息,也为进一步深入开发和利用该湖的微生物资源奠定了基础.

参考文献(References):

- [1] 郑喜玉,刘建华. 新疆的硝酸盐盐湖[J]. *盐湖研究*, 1995,3(2):20-25.
ZHENG Xi-yu, LIU Jian-hua. The nitrate salt lakes in Xinjiang[J]. *Journal of Salt Lake Science*, 1995,3(2):20-25.
- [2] 崔恒林,杨勇,迪丽拜尔·托乎提,等. 新疆两盐湖可培养嗜盐古菌多样性研究[J]. *微生物学报*, 2006,46(2):171-177.
CUI Heng-lin, YANG Yong, DILBR Tohty, et al. Biodiversity of halophilic archaea isolated from two salt lakes in Xinjiang region of China[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006,46(2):171-177.
- [3] 许学伟,吴敏,迪丽拜尔·托乎提,等. 新疆艾比湖和伊吾湖可培养嗜盐古菌多样性[J]. *生物多样性*, 2006,14(4):359-362.
XU Xue-wei, WU Min, TOHTY Dilbar, et al. Halophilic archaea diversity of Aibi Lake and Yiwu Lake in Xinjiang [J]. *Biodiversity Science*, 2006, 14(4):359-362.
- [4] 曾静,窦岳垣,王磊,等. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌 16S rDNA 全序列及 DNA 同源性分析[J]. *微生物学报*, 2002,42(2):133-137.
ZENG Jing, DOU Yue-yuan, WANG Lei, et al. Analysis of 16S rDNA sequences and DNA-DNA hybridization of moderately halophilic bacteria from Xinjiang Region[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002,42(2):133-137.
- [5] PACE N R, STAHL D A, LANE D J, et al. Analysis of natural microbial population by ribosomal RNA sequence [J]. *Advances in Microbial Ecology*, 1986, 51-55.
- [6] KNIEF C, LIPSKI A, DUNFIELD P F. Diversity and activity of methanotrophic bacteria in different upland soils [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003,69(11):6703-6714.
- [7] COTTRELL M T, KIRCHMAN D L. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000,66(12):5116-5122.
- [8] HUGENHOLTZ P, PITULLE C, HERSHBERGER K L, et al. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring[J]. *Journal of Bacterial*, 1998, 180(2):366-376.
- [9] WARD B B, MARTINO D P, DIAZ M C, et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000,66(7):2873-2881.
- [10] GRANT S, GRANT W D, JONES B E, et al. Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern[J]. *Extremophiles*, 1999,3:139-145.
- [11] MAIDAK B L, COLE J R, LILBURN T G, et al. The RDP-II (ribosomal database project)[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001,29(1):173-174.
- [12] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Research*, 1994,22:4673-4680.
- [13] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4:406-425.
- [14] FELSENTEIN J. Confidence limits of phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39:783-791.
- [15] AGOGUE H, CASAMAYOR E O, BOURRAIN M, et al. A survey on bacteria inhabiting the sea surface microlayer of coastal ecosystems[J]. *FEMS Microbial Ecology*, 2005,54:269-280.
- [16] JIANG Hong-chen, DONG Hai-liang, ZHANG Geng-xin, et al. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline Lake in Northwestern China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006,72(6):3832-3845.
- [17] DONG Hai-liang, ZHANG Geng-xin, JIANG Hong-chen, et al. Microbial diversity in sediments of Saline Qinghai Lake, China; linking geochemical controls to microbial ecology [J]. *Microbial Ecology*, 2006, 51(1):65-82.
- [18] MA Yan-he, ZHANG Wei-zhou, XUE Yan-fen, et al. Bacterial diversity of the Inner Mongolian Baer Soda Lake as revealed by 16S rRNA gene sequence analyses[J]. *Extremophiles*, 2004,8:45-51.

- ophysics, 1998, 25: 119-122.
- [11] BLACK M, CORBINEAU F, GEE H, et al. Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos[J]. **Plant Physiol**, 1999, 120: 463-471.
- [12] FU P, WILEN R W, WU G H, et al. Dehydrin gene expression and leaf water potential differs between spring and winter cereals during cold acclimation[J]. **Plant Physiol**, 2000, 156: 394-400.
- [13] PARK S Y, SHIVAJI R, KRANS J V. Heat shock response in heat-tolerance and non-tolerant variants of *Agrostis palustris* [J]. **Plant Physiol**, 1996, 111 (2): 515-524.
- [14] ABDEL H A K. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Panicum* [J]. **Journal of Experimental Botany**, 2003, 54(392): 2553-2562.
- [15] 周久亚, 刘建秀, 陈树元. 草坪草抗旱性研究概况[J]. **草业科学**, 2002, 19(5): 61-66.
ZHOU Jiu-ya, LIU Jian-xiu, CHEN Shu-yuan. Introduction on progress of turfgrass draught resistance [J]. **Pratacultural Science**, 2002, 19(5): 61-66.

(责任编辑 涂红)

(上接第454页)

- [19] SPEKSNIJDER A, KOWALCHUK GA, JONG D, et al. Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene sequences [J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2001, 67: 469-472.
- [20] PATRICK D, SCHLOSS, HANDELSMAN J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2005, 71(3): 1501-1506.
- [21] STACKEBRANDT E, RAINEY F A. **Partial and Complete 16S rDNA Sequences, Their Use in Generation of 16S rDNA Phylogenetic Trees and Their Implications in Molecular Ecological Studies** [M]. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995.
- [22] KROES I, LEPP P W, RELMAN D A. Bacterial diversity within the human subgingival crevice [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1999, 96: 14547-14552.
- [23] AMANN G, STETTER K O, LLOBET B, et al. Direct proof for the presence and expression of two 5% different 16S rRNA genes in individual cells of *Halococcus marismortui* [J]. **Extremophiles**, 2000, 4(6): 373-376.

(责任编辑 涂红)