

墨脱自然保护区嗜热放线菌多样性及生物活性初步研究^①

尹明远, 张格杰, 何建清

西藏农牧学院, 西藏 林芝 860000

摘要: 研究墨脱自然保护区嗜热放线菌的多样性、产酶潜力及其拮抗活性. 从墨脱自然保护区采集的 35 份土样制成土壤悬液, 微波分别处理 40 s, 用平板稀释法分离放线菌, 形态去重后得到有代表性的嗜热放线菌, 测定其 16S *rRNA* 基因序列, 进行系统发育分析, 将分离菌株鉴定到属; 采用生长速率法测定各菌株发酵液对 2 种细菌和 5 种农作物真菌的抑菌活性, 对分离菌株进行纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶等酶活初筛. 结果表明, 从墨脱自然保护区分离到有代表性的 24 株嗜热放线菌; 16S *rRNA* 基因序列分析表明它们分布于放线菌门放线菌纲下 4 个亚目 4 个科, 4 个属, 即链霉菌属、马杜拉放线菌属、拟无枝酸菌属和列舍瓦列氏菌属; 功能酶筛选结果显示: 22.3% 具有纤维素酶活性, 11.6% 具有淀粉酶活性, 24.6% 具有蛋白酶活性. 抑菌活性实验结果表明: 嗜热放线菌 19.6% 有抑菌活性. 研究发现墨脱自然保护区生境蕴藏丰富嗜热放线菌资源, 酶活性及抗菌活性初步筛选显示出了良好的降解和抗菌活性, 为下一步的深入研究提供良好的菌源.

关键词: 嗜热放线菌; 16S *rRNA*; 生物活性; 多样性

中图分类号: S182

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)12-0034-08

高温微生物能在高温环境下生存, 并能维持其自身生理生化过程的酶系和化合物的稳定性. 自 1969 年发现水生栖热菌(*Thermus aquaticus*)以后^[1], 高温菌就引起微生物学家的极大关注, 高温菌有两个显著的特点: 一是热稳定性功能分子, 二是生长极快且会自溶, 能在高温条件下发酵而不易受污染. 高温菌在分子生物学和工业上应用具有重要价值.

早在 19 世纪下半叶人们刚发现放线菌不久, 就有人分离到一些高温放线菌和链霉菌的高温菌群, 高温放线菌不仅可以进行生物降解、产生抗生素和酶, 还具有一定的商业潜力^[2-4]. 目前所发现的高温微生物大多数为细菌和古菌, 有少数真菌, 主要在以下属中发现较多的高温放线菌菌株: 高温单孢菌属(*Thermomonospora*)^[5-6], 糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)^[7], 高温双歧菌属(*Thermobifida*)^[5], 糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)^[8], 链霉菌属(*Streptomyces*)^[9], 假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*), 类诺卡氏菌属(*Nocardioideis*), 马杜拉放线菌属(*Actinomadura*), 小单孢菌属(*Micromonospora*), 高温多孢菌属(*Thermopolyspora*)等. 高温放线菌目前最高适应温度是 70 ℃, 尚未发现最适生长温度在 75 ℃ 以上的放线菌类群, 因此从各种高温环境如干热河谷、高温堆肥、高温热泉、深海热液口等通过纯培养分离方

① 收稿日期: 2015-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260005); 西藏农牧学院研究生创新计划项目(YJS2015-02).

作者简介: 尹明远(1991-), 男, 内蒙古赤峰安庆人, 硕士研究生, 主要从事极端环境放线菌的研究.

通信作者: 何建清, 教授, 硕士研究生导师.

法的改进来实现大量高温放线菌资源的开发,才能使其发挥更大的作用.本文中涉及的高温放线菌(Thermophilicactinobacteria)并非一个分类学上的概念,它一般是指放线菌门中生长温度在 45℃~65℃之间的一个生态群.

西藏地处我国西南边陲,素以“世界屋脊”和“地球第三极”著称^[10],墨脱自然保护区位于西藏高原的东南部,自然条件优越,森林资源丰富,是较完整的综合自然生态系统,墨脱自然保护区由南迦巴瓦峰东坡的聂拉藏布江流域自然保护区、布裙湖风景保护点和德阳沟扭角羚保护点三部分组成,地理位置约在东经 95°和北纬 29°附近,总面积 62 620 hm²,是西藏具有热带生物类型的区域之一,墨脱自然保护区具有强烈的地貌反差,夏无酷暑,冬无霜冻,年平均温度达 20℃以上,年降水量 2 500 mm,是我国年降水量最高的地区之一,特殊的自然地理环境,创造出了这里天然的生物百科全书^[11-12].特殊的生境蕴藏着极为丰富的放线菌资源,基于此,本文以墨脱自然保护区嗜热放线菌为研究对象,探索墨脱自然保护区放线菌资源种类、分布、拮抗活性及其酶的应用潜力,其结果对开发利用我国嗜热放线菌资源具有重要意义.

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源

从墨脱自然保护区采集 35 份不同林地和耕地土样,采集的样品于无菌塑料袋保存,见表 1.

表 1 墨脱自然保护区土样基本情况

样品号	地 点	植被类型	样品号	地 点	植被类型
1	根登村	耕地	19	德兴那尔东村	林地
2	文浪村	耕地	20	德兴乡(德兴村)	林地
3	旁果村	林地	21	德兴乡(德兴村)	耕地
4	旁果村	耕地	22	德兴乡(荷扎村)	林地
5	旁果村	耕地	23	德兴乡(荷扎村)	耕地
6	布龙村	林地	24	德兴乡(文浪村)	林地
7	布龙村	耕地	25	背崩乡(格林村)	耕地
8	达木乡(卡布村)	耕地	26	背崩乡(格林村)	林地
9	达木乡(达木村)	林地	27	背崩乡(巴登村)	林地
10	达木乡(卡布村)	林地	28	背崩乡(巴登村)	耕地
11	达木乡(达木村)	耕地	29	背崩乡(德尔村)	林地
12	占给卡村	林地	30	背崩乡(江新村)	耕地
13	占给卡村	耕地	31	背崩村	林地
14	桑珍卡村	耕地	32	背崩村	耕地
15	桑珍卡村	林地	33	背崩乡(波东村)	林地
16	格当村	耕地	34	背崩乡(波东村)	耕地
17	格当村	林地	35	背崩乡(阿仓村)	耕地
18	德兴那尔东村	耕地			

1.1.2 分离培养基

高氏一号培养基、ISP5 培养基、察氏培养基成分及配置参见文献[13],为抑制细菌和真菌的生长在分离培养基中均加入终质量浓度为 70 mg/L 的重铬酸钾.

1.1.3 主要试剂和仪器

脱脂奶粉、酵母提取物、蛋白胨、淀粉、微晶纤维素等试剂均为国产分析纯,DNA Polymerase,

dNTPs, DNA Marker DL-2000, pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司, 胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司; PCR 仪购自东胜公司.

1.1.4 病原菌菌株

大肠杆菌(*Escherichia coil*), 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*), 番茄灰霉菌(*Botrytis cinerea*), 南瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporum*), 粉红聚端孢(*Trichothecium roseum*), 小麦根腐菌(*Bipolaris sorokiniana*). 菌株由西藏大学农牧学院真菌实验室保存并提供.

1.2 样品预处理与菌株分离

用无菌袋盛取样品, 进行 28 ℃ 自然风干(约 7 d), 称量 10 g, 转移至 90 mL 的无菌水的三角瓶里, 置于 28 ℃ 的恒温振荡箱里 120 r/min 充分震荡, 获得样品悬浮液, 样品悬浮液于 120 W, 2 450 Hz 微波处理 40 s, 用移液枪取 1 mL 至 9 mL 无菌水的试管中, 稀释至 10^{-3} , 取 0.2 mL 涂布于分离平板上, 45 ℃ 恒温培养箱中倒置培养 7~14 d.

根据菌落形态、大小、颜色进行初步分离筛选, 利用高氏一号培养基纯化并保藏.

1.3 嗜热放线菌鉴定

经纯化后的嗜热放线菌, 采用插片法适时取片, 用番红染色在光学显微镜下观察和初步鉴定^[14]. 同时按照参考文献[15]的方法提取总 DNA, 利用细菌通用引物[PA(对应 *E. coli* 的 7-24)5'-CAGAGTTT-GATCCTGGCT-3'), PB(对应 *E. coli* 的 1540-1522)5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3']对 16S *rRNA* 序列进行 PCR 扩增, 得到的 PCR 产物直接送到杭州擎科梓熙生物技术有限公司测序, 得到的序列用 ClustalX^[16] 软件进行序列比对, 然后用 MEGA4^[17] 软件 Neighbour-Joining 法^[18] 进行系统进化树构建, 用于检验支持率的重复抽样次数为 1 000 次.

1.4 酶活筛选

淀粉酶水解、纤维素分解、蛋白酶活性筛选均参照文献[19]的方法进行.

1.5 拮抗活性

采用生长速率法测定供试放线菌发酵液的皿内抑菌作用, 选用的细菌为大肠杆菌(*Escherichia coil*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 植物病原真菌为小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*), 番茄灰霉菌(*Botrytis cinerea*), 南瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporum*), 粉红聚端孢(*Trichothecium roseum*), 小麦根腐菌(*Bipolaris sorokiniana*). 用交叉交叉法测量抑菌圈直径(*D*). 并分别按照拮抗圈直径 $D \geq 30$ mm, $30\text{ mm} > D \geq 20$ mm, $20\text{ mm} > D \geq 10$ mm 及 $D < 10$ mm 定义菌株拮抗性强弱.

1.6 生长温度

以高氏一号培养基为基础培养基检测不同试验菌株在 30 ℃~75 ℃ 的生长情况.

2 结 果

2.1 土壤样品放线菌数量分布

各样区放线菌的分布状况如表 2 所示, 由表 2 可知, 墨脱自然保护区土壤放线菌数量随生境不同而变化, 以蔗糖察氏培养基分离的放线菌数量记, 同一样区耕地放线菌数量略大于林地, 与前人的结果一致^[20-21], 主要原因可能是耕地耕作粗放, 施肥量少, 土壤疏松通气, 含有适量的水, 有机质含量适宜, 林地的放线菌数量少可能是它的森林郁避度高, 温湿变化小所致, 耕地等温差变化大, 极端高温出现的频率大.

3 种培养基的分离结果见表 3, 由表 3 可知高氏一号培养基共分离到 9 株菌, 分布在 3 个属, ISP5 培养基分离到 10 株菌, 分布在 1 个属, 蔗糖察氏培养基分离到 5 株菌, 分布在 2 个属. 由此可知, ISP5 培养基分离得到的菌株数最多, 物种单一, 高氏一号培养基分离得到的菌株多, 物种较多, 分离效果最好.

表 2 样区土壤放线菌数量

10³ 个 · g⁻¹

样区号	嗜热放线菌数量			
	植被类型	高氏一号培养基	蔗糖察氏培养基	ISP5 培养基
1	耕地	155.2	104.6	151.3
2	耕地	35.3	56.2	55.5
3	林地	80.4	67.3	92.6
4	耕地	142.5	170.9	45.7
5	耕地	133.2	265.2	126.1
6	林地	27.7	4.3	31.2
7	耕地	55.8	81.6	72.7
8	耕地	31.0	25.6	31.4
9	林地	24.5	31.2	23.2
10	林地	75.1	29.5	98.6
11	耕地	15.3	57.3	37.8
12	林地	10.4	5.1	11.1
13	耕地	38.6	38.2	33.3
14	耕地	12.7	11.9	11.4
15	林地	3.6	3.1	18.9
16	耕地	22.7	14.7	30.3
17	林地	35.2	11.4	11.2
18	耕地	21.4	5.3	33.5
19	林地	4.2	1.1	6.7
20	林地	7.3	8.7	9.8
21	耕地	7.5	13.6	9.9
22	林地	43.6	55.2	56.2
23	耕地	30.2	31.5	63.3
24	林地	35.7	39.3	32.1
25	耕地	42.5	27.4	72.7
26	林地	10.5	27.9	20.8
27	林地	35.6	12.1	7.2
28	耕地	37.7	26.7	26.4
29	林地	35.8	25.5	23.6
30	耕地	10.1	9.3	7.3
31	林地	107.9	10.4	5.7
32	耕地	2.2	1.1	1.4
33	林地	20.1	19.6	15.7
34	耕地	110.3	118.3	46.1
35	耕地	65.4	78.1	60.2

表 3 3 种培养基分离的嗜热放线菌菌株数及种属分布

分离培养基	菌株数及种属分布
高氏一号培养基	<i>Streptomyces</i> (5), <i>Lechevalieria</i> (2), <i>Amycolatopsis</i> (2)
察氏培养基	<i>Streptomyces</i> (3), <i>Actinomadura</i> (2)
ISP5 培养基	<i>Streptomyces</i> (10)

2.2 嗜热放线菌的多样性

从 35 份土样中共分离 112 株放线菌, 根据形态和培养特征去重复后获得代表性菌株 24 株, 16S *r*RNA 基因序列分析结果表明, 24 株菌分布于放线菌门放线菌纲下 4 个亚目 4 个科 4 个属, 其中链霉菌属(*Streptomyces*)为墨脱自然保护区优势放线菌, 占分离菌的 79.2%, 马杜拉放线菌属(*Actinomadura*), 拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)分别占分离菌的 8.3%, 8.3%. 列舍瓦列氏菌属(*Lechevalieria*)仅占分离菌的 4.2%.

在系统进化树上(图 1) 菌株 R13, R133 形成一个独立的进化分支. 菌株 R13 和 R133 的参比菌株为 *Streptomyces ciscaucasicus* cfcc3135, 与其相似度为 99%, 以上 2 株放线菌可能是链霉菌属(*Streptomyces*)的一个潜在的新种^[22], 新种的多相鉴定工作将在后续的工作中展开.

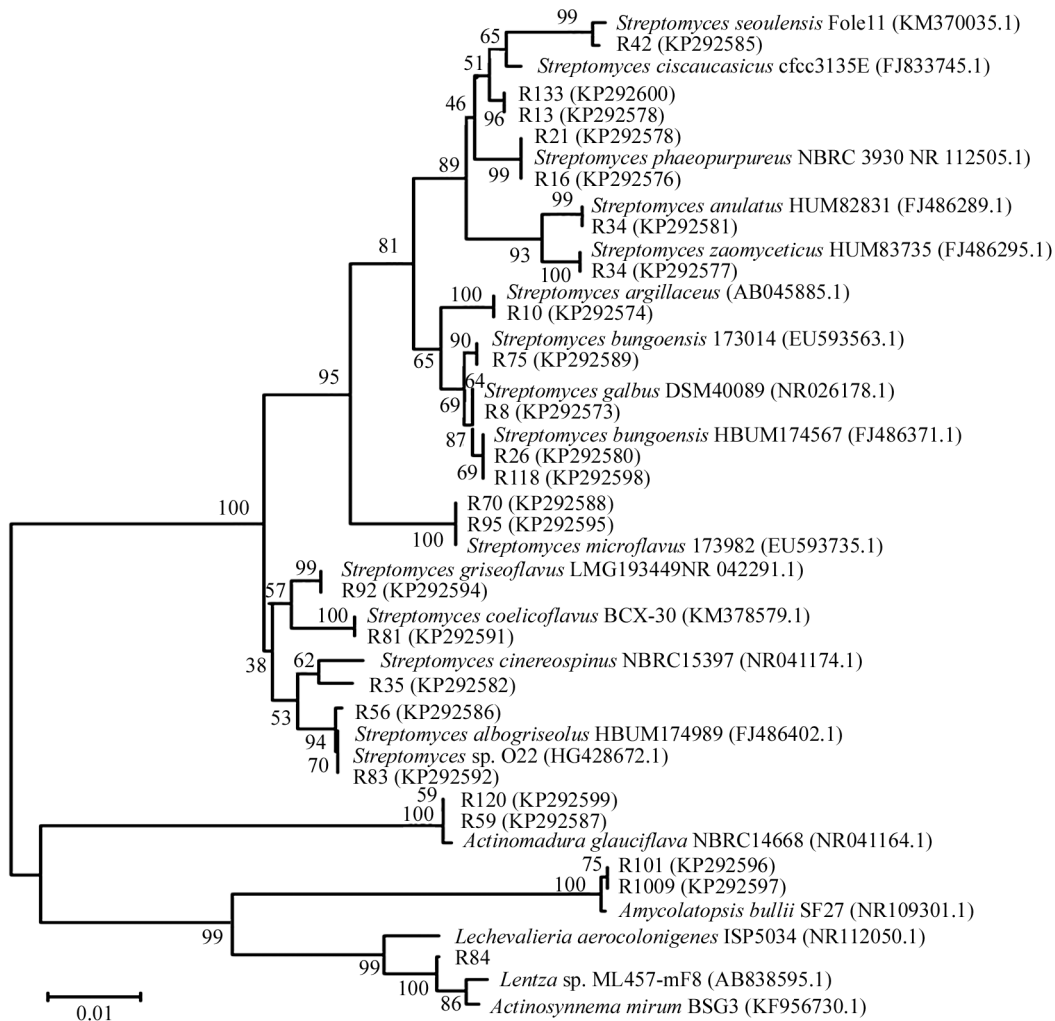


图 1 基于 16S *r*RNA 基因部分序列构建的系统进化 N-J 树

2.3 分离菌株的生长温度

112 株嗜热放线菌在 30 ℃~60 ℃都可以生长, 65 ℃~75 ℃下均不能生长, 45 ℃~55 ℃下供试菌株生长状况最好, 由此可知所分离的 112 株嗜热放线菌最适生长温度为 45 ℃~55 ℃.

2.4 酶及拮抗活性测定

对分离的 112 株嗜热放线菌进行纤维素利用、淀粉水解、蛋白酶活性测定, 结果表明(表 4), 供试菌株中, 22.3%具有纤维素酶活性, 11.6%具有淀粉酶活性, 24.6%具有蛋白酶活性. 抑菌活性实验结果表明: 112 株嗜热放线菌 19.6%有抑菌活性, 耕地土壤中拮抗放线菌百分率(54.5%)较高于林地土壤拮抗放线菌百分率(45.4%), 其中 2 株能抑制金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)生长, 9 株能抑制小麦赤霉菌

(*F. graminearum*) 生长, 10 株能抑制小麦根腐菌(*B. sorokiniana*) 生长, 6 株能抑制番茄灰霉菌(*B. cinerea*) 生长, 6 株能抑制南瓜枯萎菌(*F. oxysporum*) 生长, 6 株能抑制粉红聚端孢(*T. roseum*) 生长, 没有筛选到抑制大肠杆菌(*E. coil*) 生长的放线菌, 供试放线菌对不同靶标菌的抑制作用差异较小, 对小麦赤霉菌(*F. graminearum*) 和小麦根腐菌(*B. sorokiniana*) 拮抗效果最好, 分别达到 8.0% 和 8.9%, 对番茄灰霉菌(*B. cinerea*), 南瓜枯萎菌(*F. oxysporum*) 和粉红聚端孢(*T. roseum*) 拮抗菌株的效果次之, 达到 5.4%, 抑菌圈 $D \geq 20$ mm 的菌株有 1 株. 对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) 拮抗活性最弱, 达到 1.9%, 有 6 株可以同时抑制 3 种病原真菌. 可见, 墨脱自然保护区土壤中具有相对丰富的拮抗放线菌资源可为新抗生素的开发提供广阔空间.

表 4 代表菌株的拮抗能力及酶活筛选结果

菌株号	A	B	C	D	E	F	纤维素酶	淀粉酶	蛋白酶
R8	+	+	+	+	+++				
					$D=20$ mm		—	—	—
R10	—	—	—	—	—	—	+++	—	+
R13	—	—	—	—	—	—	+++	—	—
R16	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R20	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
R21	—	—	—	—	—	—	+++	+	—
R26	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R34	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R35	—	—	—	—	—		++	—	—
R42	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R56	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R59	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R70	—	—	—		+	—	—	—	—
R75	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R81	—	—	—	—	—	—	—	+	—
R83	—	—	—	—	—	+	—	—	—
R84	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R92	—	—	—	—	—	—	+	—	+
R95	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R101	—	—	—	—	—	—	—	—	+
R109	—	—	—	—	—	—	—	—	—
R63	—	++	—	—	+	+	+	+++	+
		$D=16$ mm							
R58	—	+	+	+	+	+	+	—	—
R55	—	+	+	+	+	—	—	—	—

注: 拮抗能力: + 为具有拮抗活性, $D < 10$, ++ 为 $20 > D \geq 10$, +++ 为 $30 > D \geq 20$, — 为不具有拮抗活性, D 表示抑菌圈直径(mm). 纤维素酶: — 为阴性, + 为阳性, +++ 为滤纸条降解大于等于 2/3; 蛋白酶和淀粉酶: — 为阴性, + 为阳性.

A 为金黄色葡萄球菌 *S. aureus*; B 为番茄灰霉菌 *B. cinerea*; C 为南瓜枯萎菌 *F. oxysporum*; D 为小麦赤霉菌 *F. graminearum*; E 为小麦根腐菌 *B. sorokiniana*; F 为粉红聚端孢 *T. roseum*.

3 讨 论

从墨脱自然保护区分离得到的 24 株代表性嗜热放线菌分布于放线菌纲下 4 个亚目 4 个科 4 个属, 墨脱自然保护区土壤放线菌组成较简单, 可能因为部分样区人为因素影响比较大, 长期以来, 由于该地区生

产水平低, 人们大量使用化肥和农药, 使得微生物区系发生复杂变化, 以至于放线菌组成不是很丰富, 微生物数量少, 在长期的进化中没有形成良好的拮抗机制^[21]. 进一步研究发现链霉菌属是该环境的绝对优势菌种, 这是土壤放线菌区系的一个显著特点. 分离的 112 株嗜热放线菌 26.3% 具有纤维素酶活性, 9.0% 具有淀粉酶活性, 15.2% 具有蛋白酶活性, 少数菌株具有较高的纤维素酶活性, 个别菌株可以产生两种酶. 综上所述墨脱自然保护区是获得酶的潜在资源地. 分离的 112 株菌株 19.6% 有抑菌活性, 其中有 1 株具有高拮抗活性 ($D \geq 20$ mm), 6 株具有广谱拮抗活性, 抗真菌数大于抗细菌数, 这与薛泉宏等人的研究结果一致^[20-21, 23], 可能是墨脱自然保护区土壤普遍呈酸性, 适合真菌生长, 其中的放线菌可能是极具潜力的抗真菌活性物质的生产者. 林地放线菌数量虽然较少, 但拮抗放线菌的百分率却相对较高. 这与何建清等人的研究结果一致^[20]. 通过筛选获得高拮抗活性的出发菌株, 对后期开发应用具有重要的作用^[23].

参考文献:

- [1] BROCK T D, FREEZE H. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Nonsporulating Extreme Thermophile [J]. Journal of Bacteriology, 1969, 98(1): 289—297.
- [2] KLEEBERG I, HETZ C, KROPPESTED R M, et al. Biodegradation of Aliphatic-Aromatic Copolyesters by *Thermomonospora fusca* and Other Thermophilic Compost Isolates [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(5): 1731—1735.
- [3] TAKEUCHI M, TAKAHASHI S, INUKAI M, et al. Helvecardins A and B, Novel Glycopeptide Antibiotics. II. Structural Elucidation [J]. The Journal of Antibiotics, 1991, 44(3): 271—277.
- [4] MOHAMEDIN A H. Isolation, Identification and Some Cultural Conditions of a Protease-Producing Thermophilic *Streptomyces* Strain Grown on Chicken Feather as a Substrate [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 1999, 43(1): 13—21.
- [5] ZHANG Z, WANG Y, RUAN J. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora* [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(2): 411—422.
- [6] YAP W H, ZHANG Z, WANG Y. Distinct Types of rRNA Operons Exist in the Genome of the Actinomycete *Thermomonospora Chromogena* and Evidence for Horizontal Transfer of an Entire rRNA Operon [J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(17): 5201—5209.
- [7] KIM S B, YOON J H, KIM H, et al. A Phylogenetic Analysis of the Genus *Saccharomonospora* Conducted with 16S rRNA Gene Sequences [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(2): 351—356.
- [8] EMBLEY T M, SMIDA J, STACHEBRANDT E. Reverse Transcriptase Sequencing of 16S Ribosomal RNA from *Faenia Rectivirgula*, *Pseudonocardia Thermophila* and *Saccharopolyspora hirsuta*, Three Wall Type IV Actinomycetes Which Lack Mycolic Acids [J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134(4): 961—966.
- [9] KIM B, SAHIN N, MINNIKIN D E, et al. Classification of Thermophilic *Streptomyces*, Including the Description of *Streptomyces Thermaocalitolerans* sp. nov [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(1): 7—17.
- [10] 刘晓燕, 张磊, 韦泽秀, 等. 用 PCR-D GGE 研究菌肥对西藏青稞土壤微生物群落多样性的影响 [J]. 西南大学学报 (自然科学版), 2014, 36(7): 39—48.
- [11] 刘务林. 西藏自然保护区 [M]. 拉萨: 西藏人民出版社, 1993: 11—13.
- [12] 刘务林. 西藏自然和生态 [M]. 拉萨: 西藏人民出版社, 2007: 13—15.
- [13] 阮继生. 放线菌分类基础 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 1—145.
- [14] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [15] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA [J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82—84.
- [16] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIK F, et al. The Clustal X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876—4882.
- [17] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596—1599.

- [18] SAITOU N, NEI M. The Neighbor-Joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406—425.
- [19] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学: 原理、方法及实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [20] 何建清, 岳海梅, 张格杰. 慈巴沟自然保护区土壤放线菌区系分析及其生物活性测定 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2010, 38(8): 83—89.
- [21] 关统伟, 王海孝, 张利莉, 等. 喀什地区土壤放线菌区系及其拮抗植物病原真菌的研究 [J]. *塔里木大学学报*, 2006, 18(3): 5—8.
- [22] STACKEBRANDT E, PUKALL R. Response to Althoff, et al. (*Mar Biol* 130: 529—536). Deriving Taxonomic Decisions from 16S rDNA: a Case Study [J]. *Marine Biology*, 1999, 133(1): 159—161.
- [23] 薛泉宏, 蔡 艳, 陈占全, 等. 青海高原东部土壤中拮抗性放线菌的生态分布特征 [J]. *中国抗生素杂志*, 2004, (29)4: 203—205.

Biological Activity and Biological Diversity of Thermophilic Actinomycete in the Moutuo Nature Reserve of Tibet

YIN Ming-yuan, ZHANG Ge-jie, HE Jian-qing

Tibet Agricultural and Animal Husbandry College, Linzhi Tibet 860000, China

Abstract: In order to analysis of the biodiversity and bioactivity of thermophilic actinomycete and the enzymes they produced. A, a total of 35 soil samples were collected from Moutuo Nature Reserve of tibet. Each sample was made into suspension, and radiated by microwave for 40 s. Actinomycetes were isolated with plate dilution method. According to morphological characters, 24 typical stains were selected from 112 isolates. The thermophilic actinomycete strains were identified by sequence analysis of 16S *rRNA*. The antimicrobial activity of all strains were tested against plant pathogenic fungi and bacteria by measuring the mycelium growth rate. Enzymes including amylase, proteinase and cellulase were detected. Based on their 16S *rRNA* sequence, the 24 representative strains were distributed into 4 genera (*Streptomyces*, *Lechevalieria*, *Amicolatopsis*, *Actinomadura*) of 4 families belong to 4 orders of actinobacteria. Among all strains, 22.3% produced cellulase, 11.6% produced amylase and 24.6% produced proteinase; 19.6% actinomycetes showed inhibiting activity to 5 fungi and 2 bacteria, among which 1 actinomycetes with high antimicrobial activities were obtained. Diverse thermophilic actinomycete were discovered from Moutuo Nature Reserve of tibetTibet. These strains have good degrading and antibacterial activity. This study would provide a good source of bacteria for further research.

Key words: thermophilic actinomycete; 16S *rRNA*; biological diversity; biological activity

责任编辑 周仁惠

