

石林石漠化地区可培养石生放线菌的多样性研究

李选文¹, 熊忠平², 周艺萍¹, 王金华¹,
韦建福^{1,3}, 陈晓溪¹, 熊 智¹

1. 西南林业大学 生命科学学院, 昆明 650224; 2. 西南林业大学 生物多样性保护与利用学院, 昆明 650224;
3. 云南师范大学 生命科学学院, 昆明 650500

摘要: 通过对石林石漠化地区可培养石生放线菌的多样性进行研究, 为推动石漠化地区生态环境恢复提供例证。实验采用高氏一号培养基对来自石林石漠化地区的 40 份岩石样品进行石生放线菌的分离纯化, 对分离获取到的若干菌株开展形态观察、生理生化实验及其 16S rDNA 序列同源性分析, 初步判定其种属地位。结果表明: 从 40 份岩石样品中共分离得到 65 株石生放线菌, 分属于 1 门 1 纲 1 目 3 科 3 个属 11 个种, 其中链霉菌属(*Streptomyces*)具备最高的相对分离率, 为 90.76%, 放线菌属(*Actinobacterium*)为 1.54%, 拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)为 7.70%, 链霉菌属极可能是石生放线菌的优势菌群。石生放线菌的 Shannon-Weiner 指数为 2.276 29, 得出石林石漠化地区石生放线菌具有丰富的多样性。

关键词: 石生微生物; 放线菌; 分离; 鉴定; 16S rDNA

中图分类号: Q93-3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)02-0070-09

云南石林地处中国西南山脉片区, 分布于云南省昆明市石林县境内, 其间拥有众多的岩溶地貌, 地理位置是 24°30′—25°03′ N, 103°10′—103°40′ E, 海拔 1 600~1 950 m, 属亚热带低纬度高原山地季风气候, 年平均气温约 16 °C^[1]。云南石林位于中国西南喀斯特地区, 是典型的喀斯特地貌, 以其连续分布面积大(超过 900 km²)、发育类型齐全、景观秀丽和生态环境脆弱而著称于世^[2-3]。云南石林的喀斯特地貌由于其脆弱的地质背景和不合理的人为活动, 导致了地上植被消失, 岩石裸露, 极易导致石漠化, 给社会带来巨大的损失^[4-6]。

石林由碳酸盐岩、白云岩和 CaCO₃ 含量较高的石灰岩组成^[7], 岩石作为特殊的生存环境, 随环境条件变化产生巨大的波动(包括太阳辐射、干旱、营养缺乏和温度波动等), 各种微生物以其特殊的生存方式在岩石的表面和内部存活。数量巨大的微生物作用于岩石的表面和内部, 参与了喀斯特地区演化的过程, 特别是生物圈岩石和矿物的风化以及土壤的形成过程等^[8]。

研究表明, 微生物可能通过两种方式加速风化碳酸盐岩, 包括直接与岩石接触或者自身分泌活性物质(如酶)^[9]。根据曹成亮等对放线菌的矿物转化作用研究发现^[10], 石生放线菌驱动了 CaCO₃ 分子重组, 重结晶, 对于碳酸盐矿物的生物转化有重要的作用。此外, 岩石上的石生放线菌还能导致碳酸盐的结构被破坏, 造成这种现象的原因是岩石表面由于微生物作用吸收不同的太阳辐射, 从而改变岩石晶体局部结构, 甚至造成一些建筑物的损伤。因此, 对石生放线菌的研究不仅可以为我们了解放线菌多样性提供便利, 丰富的

收稿日期: 2019-09-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660029); 云南省重大科技专项(202002AA1000); 云南省教育厅科学研究基金项目(2021J0176)。

作者简介: 李选文, 硕士研究生, 主要从事生物化学与分子生物学的研究。

通信作者: 熊 智, 教授, 博士研究生导师。

放线菌资源还可以对建筑物和石质文物的保护提供重要的理论依据与技术支持. 另外, 绝大部分的医用抗生素都是由放线菌产生(如链霉素(*streptomycin*)、土霉素(*oxytetracycline*)等)^[11].

目前, 关于石漠化地区微生物的特性已有一定的研究, 但却缺少对石林石漠化地区石生放线菌多样性的研究. 本研究以石林石漠化地区岩石为材料, 采用纯培养技术、形态学和 16S rDNA 序列对石生放线菌进行初步的分离鉴定, 研究石生放线菌的多样性, 为研究微生物对碳酸盐岩的风化成土过程及喀斯特地区石漠化的治理提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 岩石样品

岩石样品采自云南省石林县石林石漠化地区带有不同颜色微型菌落的岩石(图 1), 在不同的环境条件下, 随机选取 8~10 个样点, 每个样点随机取样 4~5 份, 总计挑选 40 份岩石作为研究样品. 为了防止样品被采样工具污染, 每次采样前用 75%乙醇冲洗小锤 3 次. 将采集好的岩石样品与附着的微型菌落一起装入无菌袋中密封保存, 带回实验室, 然后保存于 4℃冰箱中备用.



图 1 部分岩石样本采样点

1.2 培养基

高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20 g, KNO₃ 1 g, FeSO₃ · 7H₂O 0.01 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, NaCl 0.5 g, 琼脂 18~20 g, 蒸馏水补足 1 000 mL, pH 值为 7.4~7.6, 121℃, 0.12 MPa 灭菌 30 min.

1.3 放线菌的分离纯化及保存

材料处理: 采用土壤稀释涂布平板法^[12], 将可能含有放线菌的岩石置于高温高压灭菌的培养皿中, 用无菌水和 95%乙醇重复清洗以祛除表面的污垢, 用切石器将岩石样品凿成细小的岩片, 将其放入装有适量玻璃珠并盛有 99 mL 无菌水的锥形瓶内, 充分摇匀, 浸泡片刻后进行梯度稀释(用无菌移液枪吸取 10⁻² 悬液 1 mL, 吹入 9 mL 无菌水中即为 10⁻³, 如此重复 2 次, 可制成 10⁻⁴, 10⁻⁵ 的稀释液). 分别吸取浓度为 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ 和 10⁻⁵ 悬浮液 100 μL 滴在高氏一号培养基上, 用涂布器进行涂布, 温度为 28.5℃, 培养时间为 3~4 d. 1) 划线分离: 培养 3~4 d 待长出一定量的菌丝后, 用接种环从培养后长出的单个菌落分别挑取少许菌苔, 在高氏一号培养基平板中划线分离. 2) 培养: 划线完毕后盖上培养皿盖, 平板倒置, 28.5℃培养 3~4 d, 观察菌落的生长情况, 检查是否有杂菌掺杂, 发现杂菌后不断进行分离与纯化直到获得纯的菌株. 从中挑选 1 株单一菌株, 用砂土管法保存在 4℃的冰箱中备用.

1.4 放线菌形态学观察

石林石生放线菌形态观察采用插片法进行观察^[13]. 将分离获得的石生放线菌使用点接种法接种于高

氏一号培养基上,用无菌盖玻片倾斜 45°插在距离菌种 1 cm 左右的位置. 28.5 °C 暗培养,待菌丝生长至盖玻片 1/2 时取出盖玻片. 置于显微镜下观察菌丝、孢子等形态结构,并用电子显微镜进行拍照. 参照《放线菌系统学——原理方法及实践》^[14]及《常见细菌系统鉴定手册》^[15],对放线菌的形态展开观察鉴定.

1.5 石生放线菌 DNA 抽提及 PCR 扩增

1.5.1 石生放线菌 DNA 提取

采用酶解法^[16]小量提取菌株的 DNA,稍作改变,步骤如下:

1) 将约 480 μL 的含有溶菌酶 30 μL 的 1×TE 溶液(溶菌酶的终质量浓度为 4 mg/mL)加入到装有 50 mg 菌体的离心管中,然后放入 37 °C 摇床 12 h.

2) 加入 5 μL 质量浓度为 20 μg/mL 蛋白酶 K 和 50 μL 20% SDS 震荡混匀 1 min, 55 °C 水浴 45~60 min.

3) 加 550 μL 苯酚、氯仿、异戊醇溶液,比例为 25:24:1,震荡混匀,12 000 r/min 低温离心 10 min,吸取上清液(不要吸到中间部分).

4) 往上清液中加入 50 μL 3 mol/L 乙酸钠(pH 值为 4.8~5.2)混合加入 500 μL 异丙醇后,放入-20 °C 冰箱 2 h.

5) 12 000 r/min 低温离心 10 min,去除上清液,加入 200 μL 70%乙醇轻摇 2 次,12 000 r/min 低温离心 5 min,弃乙醇.

6) 37~55 °C 干燥后加入 50 μL 1×TE 溶解 DNA(视 DNA 量而定), -20 °C 保存备用.

1.5.2 PCR 扩增及测序^[17]

引物选择, 27F(正向引物): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGAG-3'; 1492R(反向引物): 5'-TACG-GCTACCTTGTTACGACTT-3', 引物由生工生物科技有限公司提供. 扩增体系为 50.0 μL: 10× PCR Buffer 为 5.0 μL; MgCl₂ 为 5.0 μL; dNTP 为 1.0 μL; 模板 DNA 为 2.0 μL; 27F 为 1.5 μL; 1492R 为 1.5 μL; 双蒸水补充至 50.0 μL. PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min; 55 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 2 min; 共 30 个循环. 72 °C 延伸 2 min, -20 °C 保存.

把 4.0 μL PCR 扩增后的产物和 10×上样缓冲液混合,然后用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测,将检测合格的 PCR 扩增产物送生工生物科技有限公司测序. 从公司测得的序列通过 Sequencher 4.14 软件进行拼接,将拼接好后的序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 中将菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性比对,运用软件 MEGA 6.06 构建 Neighbor-Joining 系统发育树,用自展法检测 1 000 次数数据集,然后根据系统发育树中组群间的亲缘关系对石生放线菌菌株进行分类,判定其种属关系.

1.6 分离率及多样性指数

1.6.1 分离率与相对分离率^[18]

分离率(Isolation rates, IR)是指从样本组织块中得到的菌株数与全部样本组织块数的比值,用来衡量石生放线菌的丰富程度;相对分离率(Relative frequency, RF)是指从样品中分离到的某一种放线菌的株数占分离到的总菌株数的百分率,用来衡量石生放线菌某种放线菌的优势度.

1.6.2 多样性指数(H'),即 Shannon-Weiner 指数

Shannon-Weiner 指数可以反映每一份样品所含放线菌的物种多样性程度. 按 Shannon-Weiner 指数计算^[19],若 Shannon-Weiner 指数数值越大,说明石生放线菌的多样性越高.

$$H' = - \sum_{i=1}^k P_i \ln P_i$$

式中, P_i 表示第 i 种石生放线菌的数量占该生境中全部放线菌菌株总数的比例.

2 结果与分析

2.1 石生放线菌分离结果

采用高氏一号培养基对石林石生放线菌进行分离纯化,共分离得到 65 株石生放线菌,所用岩石块

数为 40 块, 计算出分离率达到 162.50%, 种数为 11 种. 基于以上结果, 可以认为石林石生放线菌具有较高的丰富性.

2.2 菌落形态特征

根据菌落的形态特征将分离纯化后的石生放线菌初步分离合并为 11 种形态型, 整理合并编号为 SLG01, SLG03, SLG05, SLG06, SLG08, SLG11, SLG14, SLG15, SLG22, SLG23, SLG24, 根据菌落形态特征(图 2)、菌丝或孢子(图 3)及显微结构特征(表 1), 初步判定 SLG01, SLG08, SLG11, SLG14, SLG15, SLG22, SLG23, SLG24 为链霉菌属(*Streptomyces*); SLG03 为放线菌属(*Actinobacterium*); SLG05, SLG06 为拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis* sp). 因为部分菌株形态结构特征过于相似, 因此需结合分子生物学进行鉴定.

从表 1 可以看出, 分离的 65 株石生放线菌中, 根据相对分离率计算方法可得到链霉菌属的相对分离率为 90.76%, 为优势菌群, 拟无枝酸菌属的相对分离率为 7.70%, 放线菌属的相对分离率为 1.54%. 根据多样性指数计算公式, 得到高氏一号培养基分离到石生放线菌的多样性指数为 2.276 29, 表明石林石生放线菌具有丰富的多样性.

表 1 放线菌的主要特征

编号	主要形态学特征	数目/株	相对分离率/%
SLG01	产孢, 气生菌丝呈淡粉红色、粉红色至鲜粉红色, 菌丝呈树枝状延伸, 表面粗糙. 基内菌丝呈淡丁香色至暗覆盆子红色, 产红色或褐红色色素, 但有些菌株不产色素, 菌落在培养基上正反面颜色不同.	6	9.23
SLG03	产孢, 气生菌丝呈淡黄色, 菌丝细长无分隔, 菌落细密, 不透明, 菌落产一定的淡黄色色素, 菌丝较为发达, 菌落在培养基上正反面颜色不同.	1	1.54
SLG05	产孢, 孢子丝笔直. 孢子柱形, 表面光滑, 呈螺旋状分布. 基内菌丝呈无色、浅粉色至粉白色, 可裂生大量分生孢子进行散播、繁殖, 不产可溶性色素.	2	3.08
SLG06	产孢, 孢子丝笔直. 孢子椭圆形, 表面光滑. 基内菌丝无色至浅粉色、粉白色, 可裂生大量分生孢子进行散播、繁殖, 不产可溶性色素.	3	4.62
SLG08	产孢, 孢子丝直或柔曲, 有部分成螺旋趋势, 孢子卵圆形至长圆形, 表面光滑, 产生淡黄色色素.	8	12.31
SLG11	孢子丝不完全螺旋, 分枝少. 气生菌丝灰带紫色, 基内菌丝丰富、分枝不断裂, 部分菌落产淡黄色色素.	8	12.31
SLG14	孢子丝长而直, 孢子卵圆形至长圆形, 表面光滑, 气生菌丝呈灰色. 基内菌丝呈黄色至褐色, 不产可溶色素, 菌落较干燥.	6	9.23
SLG15	产孢, 孢子柱形, 表面光滑. 基内菌丝无色至浅粉色、粉白色, 可裂生大量分生孢子进行扩散、繁育, 继而衍生成绒毛状, 菌落表面起粉, 产生可溶性色素.	9	13.85
SLG22	气生菌丝灰色, 大部分孢子丝长而直, 少部分孢子丝柔且弯曲, 孢子卵圆形、柱形, 表面光滑. 基内菌丝呈乳脂色至微黄色至暗褐色.	7	10.75
SLG23	菌丝纤细、无隔、多核、分枝, 分化成基内菌丝和气生菌丝, 后者成熟后发育成孢子丝, 其形态多样(长直、波浪弯曲、螺旋、轮生), 有些菌落产黄色色素.	6	9.23
SLG24	孢子丝长而直, 孢子呈圆形和卵圆形, 表面光滑, 气生菌丝前期呈绿黄色, 后呈灰黄色, 粉状. 基内菌丝黄褐色, 菌落为淡黄色, 凸起, 菌落在培养基上正反面颜色不同.	9	13.85

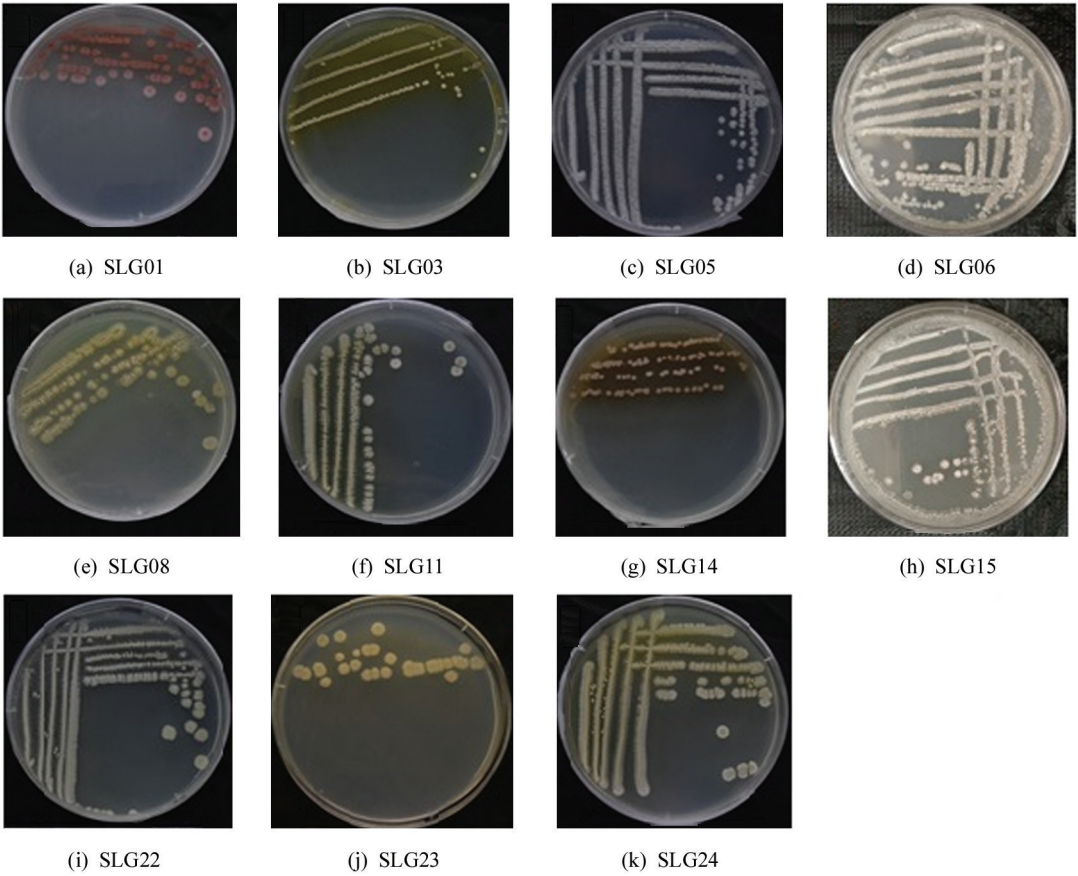


图 2 部分菌落形态

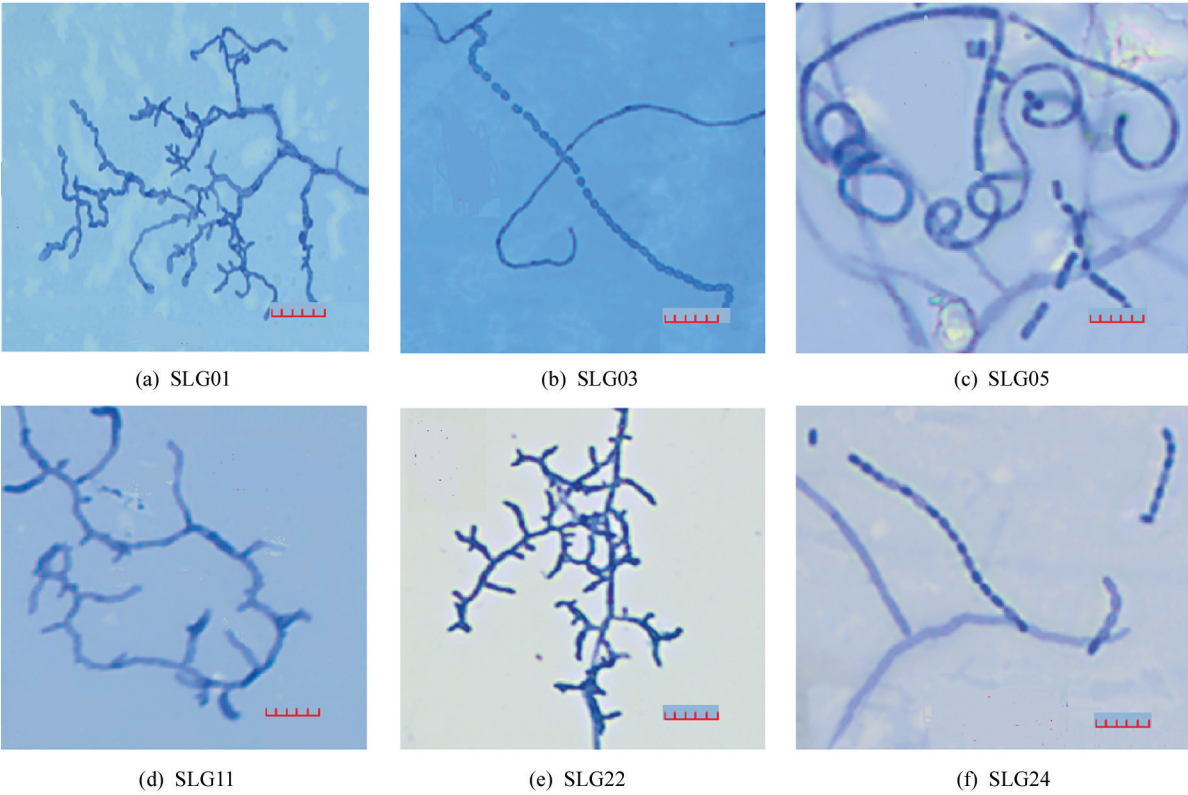


图 3 部分菌丝体显微特征(比例尺: 5 μm)

2.3 石生放线菌 16S rDNA 序列 PCR 扩增及序列分析

提取分离纯化后的石生放线菌 DNA, 检测纯度合格后采用引物 27F(正向引物): 5'-AGAGTTTGATCCT-GGCTGAG-3'; 1492R(反向引物): 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT -3', 取 PCR 扩增产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 在凝胶成像系统中观察扩增产物条带清晰, 大小均在 1 500 bp 左右(图 4).

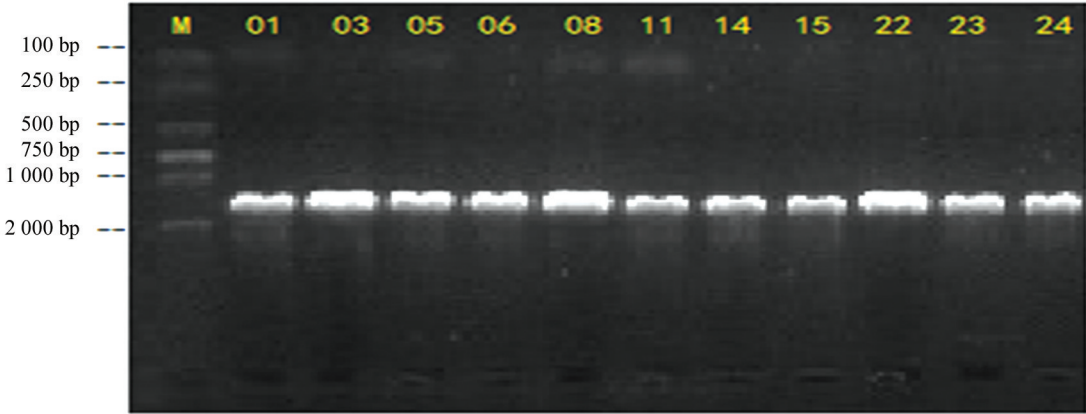


图 4 放线菌 16S rDNA 序列 PCR 电泳结果

将所获 11 种石生放线菌 16S rDNA 序列在 GenBank 中注册, 获得 GenBank 登录号(表 2). 序列提交至 GenBank 进行 Blast 同源比对, 选取同源性最高序列作为参照菌株序列. 与获得的 11 种放线菌 16S rDNA 一起, 运用软件 MEGA 6.06 构建 Neighbor-Joining 系统发育树, 用自展法检测 1 000 次数数据集, 然后根据系统发育树中组群间的亲缘关系对石生放线菌菌株进行分类, 判定其种属关系, 结果见图 5. 在系统发育树上, 分离到的石生放线菌与聚在同一系统发育树上相应菌株的 16S rDNA 序列相似度在 99%~100% 之间.

表 2 放线菌 GenBank 登录号及最大相似菌株

菌株编号	GENBANK 登录号	最大相似菌株	相似度/%
SLG01	E0Z29PYZ015	<i>Streptomyces tauricus</i> (FJ792559.1)	99
SLG03	E0Z5N95Y01R	<i>Actinobacterium</i> (KP216751.1)	99
SLG05	E0Z88TWF01R	<i>Amycolatopsis orientalis</i> (KM506911.1)	99
SLG06	E0ZBFAE301R	<i>Amycolatopsis</i> sp. (GU294689.1)	99
SLG08	E0ZF4HYV01R	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> (EU594476.1)	99
SLG11	E0ZMS7MH01R	<i>Streptomyces lavendulae</i> (AB184079.2)	99
SLG14	E0ZS4H7801R	<i>Streptomyces venezuelae</i> (MF077023.1)	99
SLG15	E0ZX8NX201R	<i>Streptomyces subutilus</i> (KR085841.1)	99
SLG22	E1013E7K01R	<i>Streptomyces fimicarius</i> (KX431245.1)	99
SLG23	E1047GGT01R	<i>Streptomyces</i> sp. (KY906809.1)	99
SLG24	E10AMD9401R	<i>Streptomyces cyaneofuscatus</i> (MF170845.1)	99

从 GenBank 登录号(表 2)和系统发育树(图 5)上看, 这 65 株菌属于 1 门 1 纲 1 目 3 科 3 个属 11 个种, SLG01 为链霉菌属公牛链霉菌(*Streptomyces tauricus*), SLG03 为放线菌属(*Actinobacterium*), SLG05 为拟无枝酸菌属东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientalis*), SLG06 为拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis* sp.), SLG08 为链霉菌属暗色产色链霉菌(*Streptomyces phaeochromogenes*), SLG11 为链霉菌属淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*), SLG14 为链霉菌属委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*), SLG15 为链霉菌属微红链霉菌(*Streptomyces subutilus*), SLG22 为链霉菌属粪生链霉菌(*Streptomyces fimicarius*), SLG23 为链霉菌属(*Streptomyces* sp.), SLG24 为链霉菌属蓝微褐链霉菌(*Streptomyces cyaneofuscatus*). 其中, SLG03, SLG06, SLG23 只能鉴定到属, 其余 8 株菌均鉴定到种, 但不能确定其真正的种属地

位,还需要进一步鉴定,链霉菌属可能是石林石漠化地区石生放线菌中的优势菌株.

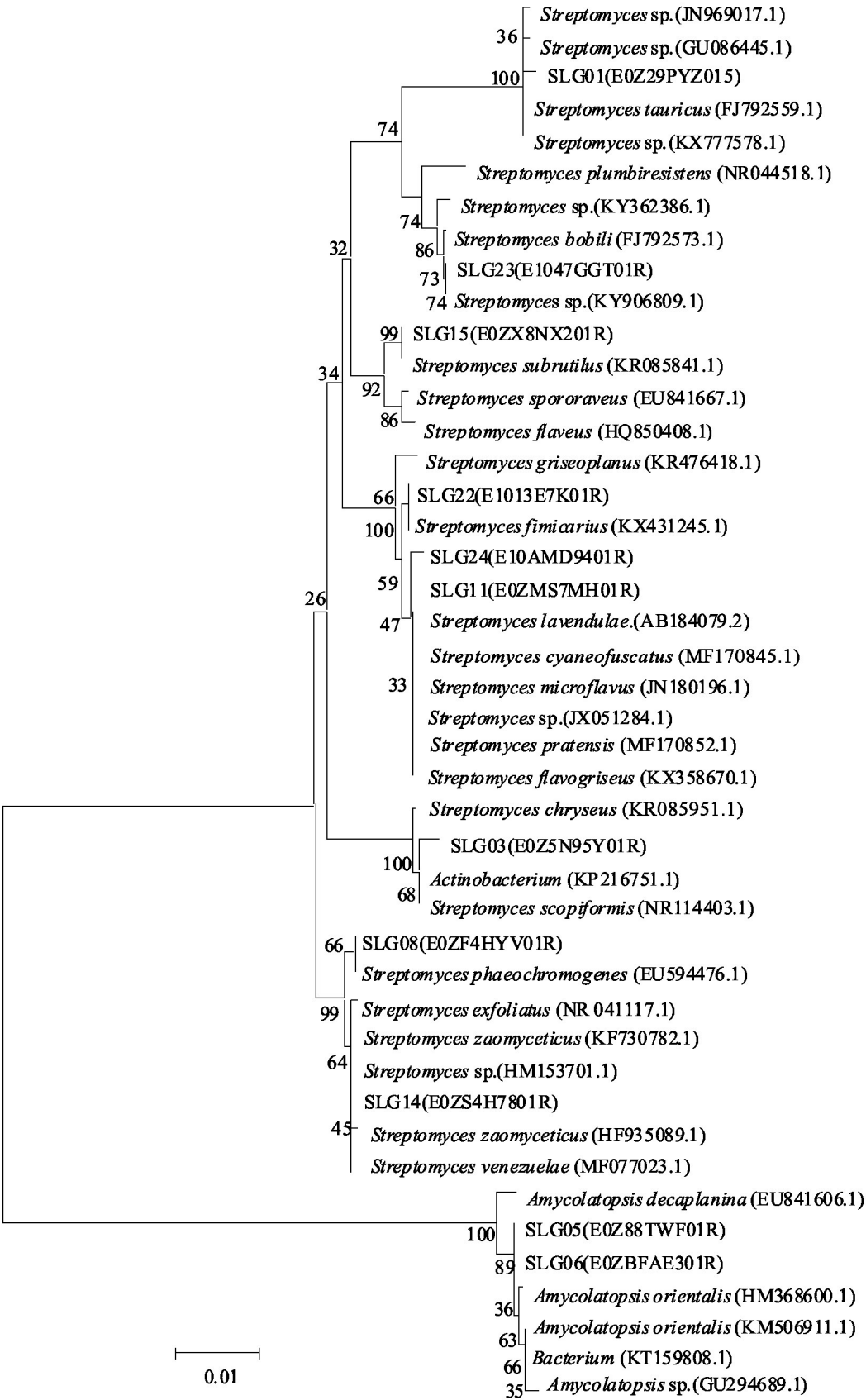


图 5 基于 16S rDNA 序列构建放线菌的系统发育树(邻接法)

3 结论与讨论

目前石漠化已经成为西南岩溶地区生态恶化的主要因素,对石生微生物——放线菌多样性的研究,不仅可为石漠化地区生态恢复与重建提供理论依据,还可以丰富放线菌的资源。我们采用高氏一号培养基对石生放线菌进行分离培养,从岩石样品中分离共得到65株石生放线菌。因为生理生化不能完全准确到放线菌的种属,需进行分子鉴定,经16S rDNA序列同源性分析及生物学表型特征分析,结果表明分离得到的65株石生放线菌隶属于1门1纲1目3科3个属11个种。分别是SLG01为链霉菌属公牛链霉菌(*Streptomyces tauricus*),SLG03为放线菌属(*Actinobacterium*),SLG05为拟无枝酸菌属东方拟无枝酸菌(*Amycolatopsis orientalis*),SLG06为拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis* sp.),SLG08为链霉菌属暗色产色链霉菌(*Streptomyces phaeochromogenes*),SLG11为链霉菌属淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*),SLG14为链霉菌属委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*),SLG15为链霉菌属微红链霉菌(*Streptomyces sub-rutilus*),SLG22为链霉菌属粪生链霉菌(*Streptomyces fimicarius*),SLG23为链霉菌属(*Streptomyces* sp.),SLG24为链霉菌属蓝微褐链霉菌(*Streptomyces cyaneofuscatus*)。说明石林石漠化地区石生放线菌具有丰富的多样性,其中链霉菌属为优势菌群。这些菌株对石漠化地区土壤改良和生态环境恢复等有极其重要的意义。

石林微生物群是一个庞大的菌群,石林石生放线菌仅是其中的一个代表。石林微生物多样性的研究是一项对于提高放线菌资源有利的研究,这对改善喀斯特地貌的环境,提高社会对喀斯特石漠化地区的关注具有重大的意义。为了能够更加透彻地研究放线菌对喀斯特地貌的影响,在后续工作中可就不同季节、不同地区、不同生长环境下的放线菌进行多样性研究,为喀斯特地貌研究提供数据参考,也能对石林的保护提供重要的理论与技术支持。另外,链霉菌属菌株作为一株可以产生天然活性物质的菌种(67%的医用抗生素都是由其产生),对于临床医学的研究有重要的前景^[19]。为了后续的研究,可以在石生放线菌解钙解镁方面做一个比较深入的研究,还可以就不同季节的喀斯特地貌石生微生物进行研究,以利于研究石生微生物的多样性,丰富石生微生物的资源。

参考文献:

- [1] 李玉辉. 中国云南石林岩溶形态类型与特征 [J]. 中国岩溶, 2002, 21(3): 165-172.
- [2] 孙 凡, 徐胜旺, 马生丽, 等. 典型喀斯特地区季节性石漠化与生态环境建设 [J]. 西南农业大学学报(社会科学版), 2011, 9(5): 1-6.
- [3] 黄钰铃, 惠二青, 李 靖. 中国西南喀斯特地区石漠化成因及防治初探 [J]. 地质灾害与环境保护, 2006, 17(1): 1-4.
- [4] 李 生. 典型喀斯特石漠化环境特征及土壤水分对造林树种的影响 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2008.
- [5] 成永生. 我国喀斯特石漠化研究现状及未来趋势 [J]. 地球与环境, 2008, 36(4): 356-362.
- [6] 段倩倩, 杨晓红, 黄先智. 石漠化地区生态桑林根际土壤微生物资源多样性研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(7): 25-29.
- [7] 田友萍, 张 捷, 宋林华, 等. 云南石林碳酸盐岩表面气生藻类群落的研究 [J]. 中国岩溶, 2003, 22(3): 203-211.
- [8] 连 宾. 碳酸盐岩风化成土过程中的微生物作用 [J]. 矿物岩石地球化学通报, 2010, 29(1): 52-56.
- [9] 连 宾, 陈 烨, 朱立军, 等. 微生物对碳酸盐岩的风化作用 [J]. 地学前缘, 2008, 15(6): 90-99.
- [10] 曹成亮, 连 宾. 碳酸盐岩小生境石生放线菌及其矿物转化作用 [C] //中国矿物岩石地球化学学会第九次全国会员代表大会暨第16届学术年会文集, 2017: 541-542.
- [11] BÉRDY JÁNOS. Thoughts and Facts About Antibiotics: Where We are Now and Where We are Heading [J]. Pubmed, 2012, 65(8): 385-395.
- [12] 安呈洁, 宋宏刚, 王美妮, 等. 佳木斯市郊区不同土地利用方式下土壤微生物多样性 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(35): 94-95, 101.
- [13] 张影珍, 马养民, 王鹏飞, 等. 秦岭药用植物防风内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究 [J]. 青岛科技大学学报(自然科学版), 2015, 36(2): 155-159.

- [14] 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.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] 李秀萍, 阿力木江, 吾甫尔·米吉提. 一株具有抗菌活性的水浮莲内生放线菌的鉴定 [J]. 新疆农业科学, 2010, 47(7): 1370-1375.
- [17] WOESE C R, KANDLER O, WHEELIS M L. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(12): 4576-4589.
- [18] 曹丹丹, 路 浩, 赵宝玉, 等. 变异黄芪内生真菌种群分布特征 [J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(12): 2057-2066.
- [19] 陈义光, 张晓蓉, 张 丽, 等. 具抗菌活性海洋放线菌菌株 JMC 06001 的分离和鉴定 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 40-44.

Study on Diversity of Culturable Rock-Inhabiting Actinomycetes in Shilin Rocky Desertification Area

LI Xuan-wen¹, XIONG Zhong-ping², ZHOU Yi-ping¹,
WANG Jin-hua¹, WEI Jian-fu^{1,3}, CHEN Xiao-xi¹, XIONG Zhi¹

1. College of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

2. College of Biodiversity Conservation and Utilization, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China;

3. College of Life Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China

Abstract: The purpose of this paper is to study the diversity of culturable rock-inhabiting actinomycetes in Shilin rocky desertification area and to provide examples for promoting the restoration of ecological environment in rocky desertification areas. The Gause I medium was used to separate and purify the rock-inhabiting actinomycetes from 40 rock samples collected from the Shilin rocky desertification area. The morphology of several isolated strains was observed, and physiological and biochemical experiments and 16S rDNA sequence homology analysis were made to preliminarily determine their species status. A total of 65 rock-inhabiting actinomycetes belonging to 1 phylum, 1 class, 1 order, 3 families, 3 genera and 11 species were isolated from the 40 rock samples, of which *Streptomyces* had the highest relative separation rate (90.76%), the relative separation rate of Actinomycetes and Amycolatopsis was 1.54% and 7.70%, respectively. So *Streptomyces* is very likely to be the dominant microflora of rock-inhabiting actinomycetes. The Shannon-Weiner index of the rock-inhabiting actinomycetes was 2.276 29. So, there is rich diversity of rock-inhabiting actinomycetes in Shilin rocky desertification area.

Key words: rock-inhabiting microbe; actinomycete; isolation; identification; 16S rDNA

责任编辑 周仁惠