

研究报告

怒江大峡谷怒江州段土壤放线菌多样性

徐方继¹ 李桂鼎³ 李沁元^{1,2} 陈秀³ 姜成林¹ 姜怡^{1*}

(1. 云南大学生命科学学院 云南省微生物研究所 云南 昆明 650091)

(2. 云南大学生命科学学院实验中心 云南 昆明 650091)

(3. 东北大学生命与健康学院 微生物药物研究所 辽宁 沈阳 110819)

摘要:【背景】怒江大峡谷怒江州段凭借独特的地理环境、丰富的动植物多样性以及极少的人为干扰, 拥有很高的生物多样性调查价值, 但对于该生境中的放线菌多样性研究尚未见相关报道。【目的】研究怒江大峡谷怒江州段土壤放线菌多样性情况。【方法】利用 Illumina HiSeq 平台对怒江州段土壤样品放线菌免培养多样性进行高通量测序, 通过相对丰度、物种聚类、主成分分析对不同样品中放线菌组成及其相似性进行了分析。同时通过 9 种不同类型培养基结合有效的预处理方法和非目的菌抑制剂进行放线菌的纯培养分离。【结果】高通量测序共获得 Tag 数目 474 203 条, OTU 数目 15 671 个, 它们分布于细菌域下的 47 个门 90 个纲 170 个目 320 个科 561 个属。通过不同样品的比较, 发现 BS、F-G、F-L、L 样品的放线菌免培养多样性普遍优于丙中洛样点的 BB、BT、BH 样品。纯培养分离共获得 351 株放线菌, 分布于放线菌纲下 8 个目 14 个科 26 个属。所用 9 种培养基中, YIM171 培养基的分离效果最好。通过比较不同样品的放线菌纯培养多样性, 丙中洛混合样明显优于其他样品。【结论】怒江大峡谷怒江州段土壤样品中放线菌多样性丰富, 应进一步挖掘其放线菌资源潜力, 为今后放线菌次生代谢产物的开发提供有效的菌株资源。

关键词: 怒江大峡谷, 土壤, 放线菌多样性, 16S rRNA 基因

Diversity of actinomycetes in soil from Nujiang Grand Canyon in Nujiang Prefecture

XU Fang-Ji¹ LI Gui-Ding³ LI Qin-Yuan^{1,2} CHEN Xiu³ JIANG Cheng-Lin¹ JIANG Yi^{1*}

(1. Yunnan Institute of Microbiology, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(2. Laboratory Center, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(3. Institute of Microbial Pharmaceuticals, College of Life and Health Sciences, Northeastern University, Shenyang, Liaoning 110819, China)

Abstract: [Background] Nujiang Prefecture (Nujiang Grand Canyon), which possess unique geographic conditions and abundant flora and fauna diversity, making great value to study its

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31460005, 31270001)

*Corresponding author: Tel: 86-871-65034073; E-mail: jiangyi@ynu.edu.cn

Received: June 12, 2017; Accepted: October 25, 2017; Published online (www.cnki.net): November 08, 2017
基金项目: 国家自然科学基金(31460005, 31270001)

*通信作者: Tel: 86-871-65034073; E-mail: jiangyi@ynu.edu.cn

收稿日期: 2017-06-12; 接受日期: 2017-10-25; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-11-08

biodiversity. However, little research have been done to investigate the actinomycetal diversity in this area. **[Objective]** Research the diversity of soil actinomycetes in Nujiang Grand Canyon. **[Methods]** High throughput sequencing (Illumina HiSeq platform) was employed to investigate the actinomycetal culture-independent diversity of soil samples. We used several bioinformational figures to making comparison of the differences in actinomycetes composition structure among the seven samples. Meanwhile, the suited culture-dependent isolation methods were determined by tested different pre-treatment methods, undesired bacteria inhibitors and multiple isolation media. **[Results]** A total of 474 203 bacteria genes and 15 671 OTUs were obtained, the results distributed in 47 phyla, 90 classes, 170 orders, 320 families, 561 genera. Specific to the actinomycetal phylum, high throughput sequencing detected 9 classes, 53 families, 80 genera. The analysis of the diversity between different samples showed that the samples, which called BS, F-G, F-L, L, exhibited better condition than BB, BT, BH. The results showed that 351 actinomycetal strains were obtained from seven soil samples. It belonged to 8 orders, 14 families, 26 genera. YIM171 medium showed the greatest isolation results. The sample of BH exhibited the most rich actinomycetal diversity obviously. **[Conclusion]** Abundant actinomycetal diversity in this area was mined out by this research. Further bioactivity potential should be tested to offer much more actinomycetal strains for the exploitation of secondary metabolite.

Keywords: Nujiang Grand Canyon, Soil, Actinomycetal diversity, 16S rRNA gene

怒江发源于我国青藏高原, 流经西藏、云南等地, 在云南省境内蜿蜒长达 650 km, 在怒江傈僳族自治州境内 310 km。怒江奔腾于碧罗雪山山脉和高黎贡山脉之间, 形成了从云南怒江傈僳族自治州(本研究中简称为怒江州)贡山独龙族怒族自治县的丙中洛乡至保山市龙陵县的老卡, 长 310 km、平均深度为 2 km 的大峡谷^[1-2]。与我国典型河流(长江、黄河等)相比, 怒江所流经区域, 特别是云南怒江州处于一个非常少见的高海拔、高动植物多样性(怒江州段动植物多样性极其丰富, 森林覆盖率达 44%^[3])、气候类型多样、受人为因素影响相对较小的区域。对于怒江大峡谷的各方面研究主要集中于民俗文化^[4]、地质^[5]、水文^[6]、动植物^[7-8]等方面, 而对放线菌多样性研究方面还没有相关研究报道。

众所周知, 土壤作为地球生态系统中分布较为广阔的一种生境, 分布于各种生态系统(森林^[9-11]、沙漠^[12-14]、高原^[15-18]等)。复杂的地理环境特点及多样的理化性质极大地丰富了土壤微生物群落结构的多样性和功能性^[19]。作为土壤中的重要组成部分, 土壤微生物承担着有机物质降解、无机养分循环的作用, 同时保持与植物十分密切的互动关

系^[20-21]。放线菌门作为细菌域的重要成员之一, 不仅能够调节土壤养分, 而且是微生物来源抗生素的大量产生者^[22]。据统计^[23], 在 20%–25% 具备生物活性的天然产物中, 10% 来源于微生物, 而在这些微生物中有 45% 来源于放线菌。

本研究分别利用二代高通量测序 Illumina HiSeq 平台和平板分离纯化技术调查怒江大峡谷怒江州段土壤放线菌多样性, 初步探明怒江州段各样点的放线菌组成情况, 获得了大量放线菌菌株资源, 为研究此区域放线菌资源提供了一定资料和借鉴。

1 材料与amp;方法

1.1 样品信息

从怒江大峡谷怒江州段选取 4 个样区(即丙中洛、石月亮至贡山、福贡至泸水、泸水)进行土壤样品采集, 每份土样均采用五点采样法, 剥除表层土后用采样铲采集 5–10 cm 深土壤样品, 收集至无菌袋中, 每个样区获得约 15 份土壤样品, 4 个样区共得到 60 份, 带回实验室后通过观察比较不同土样的外观特点进行初步整理和分类, 包

括颜色、土质、土壤颗粒形状以及土壤所夹杂的物质类型等方面。通过比较观察发现,丙中洛样区各土样呈现出较为多样化的情况,所以将具有同样土壤外观特点的样品分为一组。该样区共分为4组,包括黑土夹杂页岩组(BB)、团状土壤颗粒组(BT)、沙状土组(BS)以及混合样组(BH)。其余3个样区的土壤类型较单一,各作为混合样进行研究,即S-G、F-L、L样品。每份土样分为3部分,分别用于土壤理化指标检测、高通量测序中土壤总DNA的提取、放线菌纯培养分离。所测土样的理化指标包括水分含量、有机质含量、pH值、总溶解性固体及电导率,由云南同川农业分析测试技术有限责任公司完成。

1.2 怒江州段土壤放线菌免培养多样性研究

1.2.1 主要试剂和仪器

土壤DNA基因组提取试剂盒, TIANGEN公司; Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer、高效高保真酶、NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina 建库试剂盒, New England Biolabs公司; GeneJET 胶回收试剂盒, Thermo Scientific公司。PCR仪, Bio-Rad公司。

1.2.2 样品总DNA提取

采用CTAB^[24]方法对适量样本的基因组DNA进行提取,之后利用浓度为0.8%–1.0% (质量体积比)的琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度。

1.2.3 16S rRNA 基因 V3–V4 区的扩增和上机测序

以稀释后的基因组DNA为模板,使用带Barcode的特异引物,引物为16S V3–V4区引物341F (5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3')和806R (5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')。PCR反应体系(30 μL): Phusion Master Mix (2×) 15 μL, Primer (2 μmol/L) 3 μL, gDNA (1 ng/μL) 10 μL (5–10 ng), ddH₂O 2 μL。PCR反应条件: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30个循环; 72 °C 5 min。根据PCR产物浓度进行等浓度混样,充分混匀后使

用1×TAE浓度2%的琼脂糖胶电泳纯化PCR产物,选择主带大小在400–450 bp之间的序列,割胶回收目标条带。然后将扩增产物送至北京诺禾致源生物信息科技有限公司用HiSeq2500 PE250进行上机测序。

1.2.4 测序数据处理

根据Barcode序列和PCR扩增引物序列从下机数据中拆分出各样品数据,截去Barcode和引物序列后对每个样品的Reads进行拼接,得到的拼接序列为原始Tags数据(Raw tags);过滤低质量、短长度以及嵌合体后得到高质量的最终用于分析的Tags数据(Effective tags)。对所有样品的全部Effective tags进行聚类后,默认以97%的一致性(Identity)将序列聚类成为操作分类单元(OTU),同时会选取OTU的代表性序列进行物种注释,获得分类学信息并分别在各个分类水平门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)、种(Species)统计各样本的群落组成。

(1) 单样品复杂度分析

使用R软件(version 2.15.3)绘制稀释曲线。

(2) 放线菌丰度统计及物种分布情况

通过利用SPSS19 (<https://www.ibm.com/>)分别制作样品相对丰度图,重点分析样品中放线菌在各分类水平上的丰度及分布情况。

(3) 多样品比较分析

多样品比较分析(Beta diversity)是利用CANOCO软件(v.5: <http://www.canoco5.com/>)制作主成分分析图(PCA)来分析样品间放线菌群落结构的相似性。

1.3 怒江州段土壤放线菌纯培养多样性研究

1.3.1 主要试剂和仪器

细菌通用引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成;DNA提取步骤中的溶菌酶、蛋白酶、抽提化学试剂(苯酚、氯仿、异戊醇等)及PCR体系所用的Taq DNA聚合酶、dNTPs均购自昆明云科生物科技有限公司。PCR仪、电泳仪, Bio-Rad

公司。

1.3.2 放线菌的分离

(1) 预处理方法

将 2 g 土样于 28 °C 室温风干 7 d, 在 80 °C 干热处理 1 h, 0.1% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 溶液中分散处理 1 h, 使用超声仪处理 40 s。

(2) 培养基(g/L)

将以上通过预处理的土壤悬液涂布于以下前 9 种培养基(pH 7.2), 培养基中添加重铬酸钾 70 mg/L 作为细菌和真菌抑制剂, 稀释梯度为 10^2 、 10^3 倍。

1) YIM 171: 甘油 10.0, 天门冬素 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCO_3 0.3, 复合维生素 0.01, 微量盐 1.0, 琼脂粉 15.0。2) HV 培养基: 腐殖酸 1.0, Na_2HPO_4 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, CaCl_2 1.0, 复合维生素 0.01, 琼脂粉 15.0。3) 甘露醇-丙氨酸培养基: 甘露醇 10.0, 丙氨酸 1.0, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, CaCO_3 0.2, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 微量盐 1.0, 复合维生素 1.0, 琼脂粉 18.0。4) 木质素培养基: 木质素 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.7, KH_2PO_4 2.4, K_2HPO_4 5.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 微量盐 1.0, 琼脂 15.0。5) 甘油精氨酸培养基: 甘油 6.0, 精氨酸 1.0, K_2HPO_4 0.5, MgSO_4 0.5。6) 葡萄糖-天门冬素琼脂培养基: 葡萄糖 10.0, 天门冬素 0.5, 牛肉膏 2.0, K_2HPO_4 0.5, pH 7.2。7) 棉籽糖-组氨酸培养基: 棉籽糖 10.0, 组氨酸 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, FeSO_4 0.01, 琼脂粉 15.0。8) YIM 6: 可溶性淀粉 10.0, 酪素 0.3, KNO_3 2.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, NaCl 2.0, K_2HPO_4 2.0, CaCO_3 0.02, FeSO_4 0.01, 复合维生素 0.01, 琼脂粉 15.0。9) YIM 212: 海藻糖 5.0, 脯氨酸 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, NaCl 1.0, CaCl_2 2.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 复合维生素 0.01, 琼脂粉 15.0。10) YIM38: 酵母粉 4.0, 葡萄糖 4.0, 麦芽膏 2.0, 微量盐 1.0, 复合维生素 0.01, 琼脂粉 15.0。

(3) 菌株的分离纯化培养

将涂布好的平板于 28 °C 倒置培养 14 d, 待放线菌菌落长出后根据其生理形态特点用竹签挑取菌落至 YIM38 琼脂斜面培养基。将斜面置于 28 °C 倒置培养 7-10 d, 摒弃重复和污染菌株后编号。使用 YIM 38 培养基平板收集菌体用于基因组提取, 并将菌株保藏于 30% 甘油管, -20 °C 保存。

(4) DNA 提取、扩增及测序比对

采用酶法小量提取^[25]进行 DNA 提取。细菌 16S rRNA 基因的扩增使用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系 (50 μL): 10 \times Buffer 5 μL , dNTPs (10 mmol/L) 4.0 μL , 27F 和 1492R (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.0 μL , *Taq* 酶 (5 U/ μL) 0.3 μL , ddH₂O 37.7 μL , DNA 模板 1.0 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min 30 s, 32 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。

将所得 PCR 产物用 1.0% 的凝胶电泳检测后, 送至上海博尚生物技术有限公司进行测序。测序结果用 EzTaxon 数据库 (<http://www.ezbiocloud.net/>) 进行比对。利用 MEGA 7.0^[26] 以邻接法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树, Bootstrap 1 000 次用于评价进化树分支聚类的稳定性。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质测定结果

表 1 表示了 7 个样品的样品地理位置、采样情况及理化指标结果, 包括水分、pH 值、有机质、电导率和总溶解性固体。

2.2 怒江州段土壤放线菌免培养多样性研究

2.2.1 测序数据处理结果

原始下机数据经过拼接以及多重过滤后最终得到用于后续分析的 Tag 序列, 各样品的序列统计结果如表 2 所示。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information

样品分区 Sampling areas	经纬度 Longitude & Latitude	样品特征 Characteristics	样品 Sample	采样海拔 Altitude (m)	土壤类型 Soil type	水分 Water (%)	pH	有机质 Organic matter (g/kg)	电导率 Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	总溶解性 固体 TDS (mg/L)
丙中洛 Bingzhongluo village	98.65°E, 28.027°N	黑土夹杂页岩	BB	1 743	森林	21.34	6.6	94.5	899.9	463.4
		团状颗粒土	BT	1 743	森林	30.20	7.1	42.6	499.0	256.2
		沙状土	BS	1 743	森林	11.43	7.2	18.2	175.2	89.7
		混合样	BH	1 743	森林	22.15	6.8	33.0	584.8	300.4
石月亮至贡山 Shiyueliang village-Gongsha n county	98.68°- 98.89°E, 27.74°- 27.25°N	混合样	S-G	1 522	森林	17.74	7.2	19.0	454.8	237.8
福贡至泸水 Fugong county-Lushui county	98.87°- 98.86°E, 26.91°- 25.82°N	混合样	F-L	1 225	森林	6.18	7.7	10.8	168.9	87.4
泸水 Lushui county	98.86°E, 25.82°N	混合样	L	845	森林	3.70	6.6	11.3	156.1	79.3

表 2 样品测序数据统计

Table 2 Sequencing data statistics

样品 Sample	原始 Tags 序列数目 Raw tags	有效 Tags 序列数目 Effective tags	有效 Tags 序列 平均长度 Average length	OTU 数量 Number of OTUs
BB	86 341	73 083	415	1 312
BT	84 488	70 879	422	832
BS	81 984	70 288	418	2 911
BH	71 828	58 930	419	789
S-G	84 585	69 288	415	3 380
F-L	72 477	60 630	417	3 309
L	85 750	71 105	414	3 138

2.2.2 样品稀释度曲线

通过样品稀释度曲线(图 1)可知, 7 个样品测序数据量合理, 总体上物种丰富程度在样本之间存在一定差异。BB、BH、BT 3 个样品中细菌丰富程度明显低于 BS、S-G、F-L、L 4 个样品。

2.2.3 放线菌群落结构分析

由于着眼于土壤放线菌多样性, 所以抽取放线菌门下属(Genus)水平 OTU 数目制作相对丰度图。图 2 表示了各样品在属水平上的放线菌相对丰度

情况。

在属水平上, 测序共检测到 80 个属, BB 样品中检测到 43 个属, BT、BH 样品都检测到了 30 个属, BS、S-G、F-L、L 样品分别检测到 45、65、59、70 个属。由图 2 可见, 链霉菌属(*Streptomyces*) (12%)、

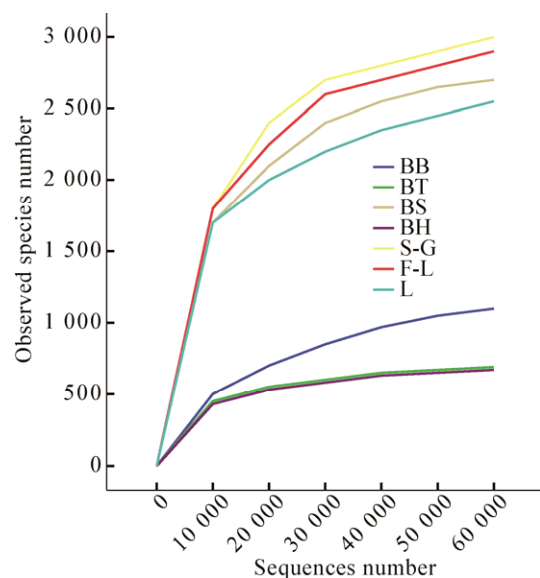


图 1 稀释度曲线

Figure 1 Rarefaction curve

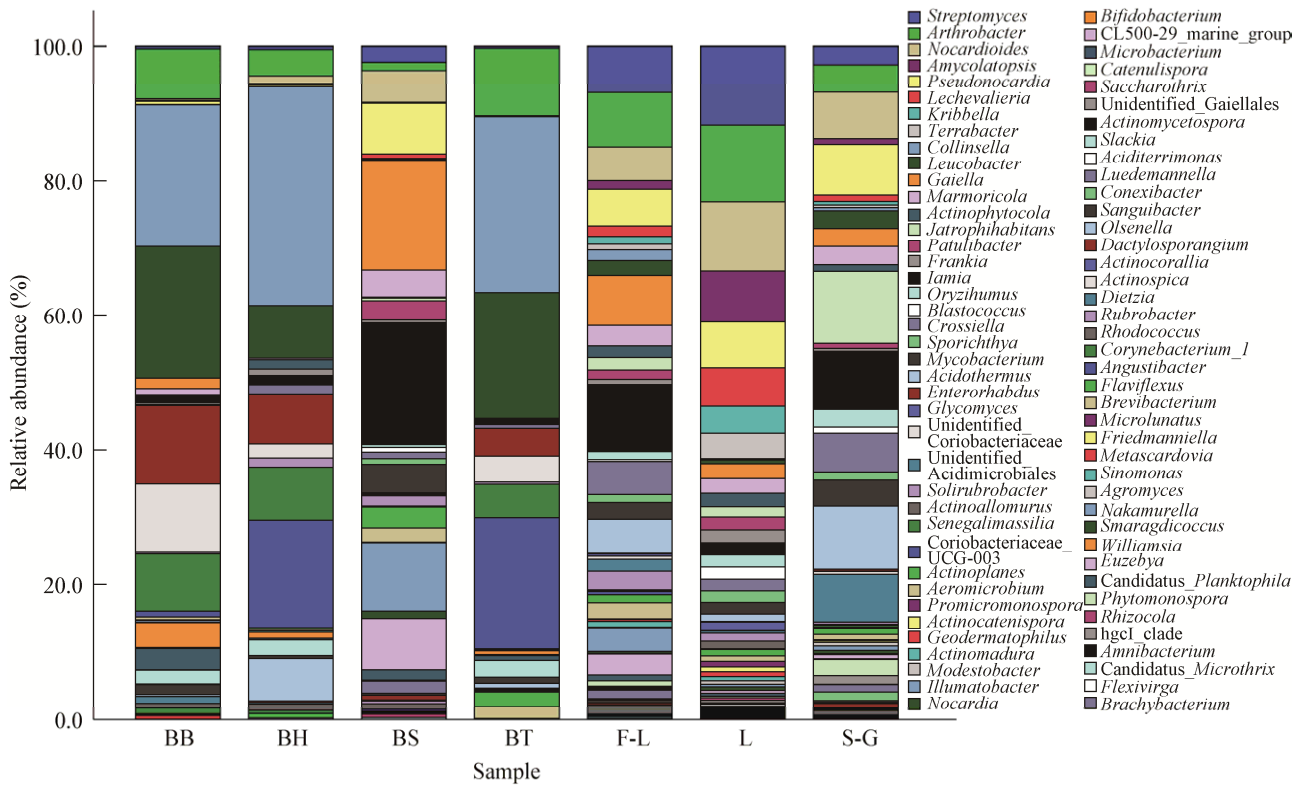


图 2 不同样品间属水平上放线菌相对丰度情况

Figure 2 The relative abundance of actinomycetes on the genus level among different treatments

节杆菌属 (*Arthrobacter*) (11%)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) (10%)、鱼孢菌属 (*Sporichthya*) (8%)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*) (7%)、列舍瓦里尔菌属 (*Lechevalieria*) (6%)、地杆菌属 (*Terrabacter*) (4%)、韩国生工菌属 (*Kribbella*) (4%)等 27 个属在 L 样品中丰度较高; *Iamia* (9%)、*Crossiella* (6%)、*Jatrophihabitans* (11%)、*Acidothermus* (9%)、*Unidentified_Acidimicrobiales* (7%)共 5 个属在 S-G 样品中有较高丰度; *Iamia* 在 F-L 样品中丰度较高, 占 10%; *Collinsella* (21%)、*Leucobacter* (20%)、*Enterorhabdus* (12%)、*Senegalimassilia* (9%)、*Unidentified_Coriobacteriaceae* (10%)共 5 个属在 BB 样品中丰度较高; *Leucobacter* (20%)、*Collinsella* (27%)、*Coriobacteriaceae_UCG-003* (20%)在 BT 样品中丰度较高; *Collinsella* (33%)在 BH 样品中丰度较高; *Gaiella* (17%)、*Iamia* (18%)共 2 个属在 BS 样品中丰度较高。属水平上, L 样品中的放线菌多样性程度最高。

2.2.4 基于属水平上各样品间放线菌群落组成相似性分析

通过使用 PAST 软件对 7 个样品中高通量测序所得放线菌门下各属进行主成分分析 (Principle components analysis, PCA), 以期探明各样品之间放线菌群落组成的相似性。

图 3 中, BB、BT、BH 样品基本上聚在第四象限, BS、S-G、F-L 样品聚在第二象限, 而 L 样品

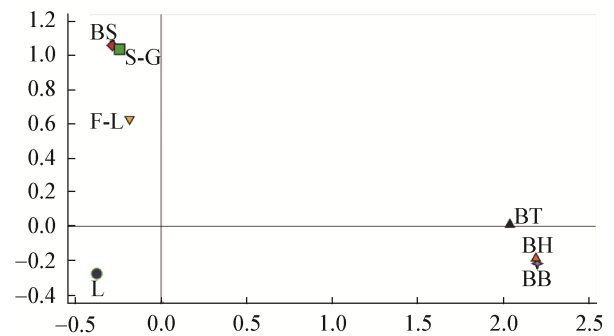


图 3 主成分分析图

Figure 3 Principle components analysis (PCA)

则单独处于第三象限。说明这三部分样品之间的放线菌群落组成差异性较大,而各部分所包含的样品之间拥有相似的放线菌组成。

2.3 怒江州段土壤放线菌纯培养多样性研究

2.3.1 纯培养放线菌多样性

通过分离方法的探究,找到了较适合怒江州段7个土壤样品的分离方法和培养基成分。统计了此区域分离得到的各放线菌菌株的分类地位、系统发育关系以及潜在新分类单元,分析了不同样品的纯培养多样性情况。

通过纯培养方法从怒江大峡谷怒江州段4个样点7个土壤样品中共分离到放线菌351株,分布于链霉菌目(*Streptomycetales*)、微球菌目(*Micrococcales*)、棒状菌亚目(*Corynebacteriales*)、丙酸杆菌目(*Propionibacteriales*)、动球菌目(*Kineosporiales*)、假诺卡氏菌目(*Pseudonocardiales*)、链孢囊菌目(*Streptosporangiales*)、小单孢菌目(*Micromonosporales*)共8个目,链霉菌科(*Streptomycetaceae*)、微杆菌科(*Microbacteriaceae*)、诺卡氏菌科(*Nocardiaceae*)、微球菌科(*Micrococcaceae*)、分枝杆菌科(*Mycobacteriaceae*)、小单孢菌科(*Micromonosporaceae*)、间孢囊菌科

(*Intrasporangiaceae*)、短杆菌科(*Brevibacteriaceae*)、原小单孢菌科(*Promicromonosporaceae*)、纤维单孢菌科(*Cellulomonadaceae*)、类诺卡氏菌科(*Nocardioidaceae*)、动球菌科(*Kineosporiaceae*)、假诺卡氏菌科(*Pseudonocardiaceae*)、链孢囊菌科(*Streptosporangiaceae*)共14个科,链霉菌属(*Streptomyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、壤球菌属(*Agrococcus*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)、*Microterricola*、地杆菌属(*Terrabacter*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、类节杆菌属(*Paenarthrobacter*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)、纤维单孢菌属(*Cellulomonas*)、威廉姆斯氏菌属(*Williamsia*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、气微菌属(*Aeromicrobium*)、动球菌属(*Kineococcus*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、野野村菌属(*Nonomuraea*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)共26个属。其具体分布情况如表3所示。属水平上的系统发育关系详见图4。

表3 分离所得放线菌在各分类水平上分布情况

Table 3 Taxonomic status of the isolated actinomycetes results

Order	Family	Genus
Streptomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces, Kitasatospora</i>
Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium, Agrococcus, Agromyces, Microterricola</i>
	Intrasporangiaceae	<i>Terrabacter</i>
	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium</i>
	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter, Paenarthrobacter</i>
	Promicromonosporaceae	<i>Cellulosimicrobium, Promicromonospora</i>
	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>
	Corynebacteriales	Nocardiaceae
Mycobacteriaceae		<i>Mycobacterium</i>
Propionibacteriales	Nocardioidaceae	<i>Kribbella, Nocardioides, Aeromicrobium</i>
Kineosporiales	Kineosporiaceae	<i>Kineococcus</i>
Pseudonocardiales	Pseudonocardiaceae	<i>Saccharothrix, Pseudonocardia</i>
Streptosporangiales	Streptosporangiaceae	<i>Nonomuraea</i>
Micromonosporales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>

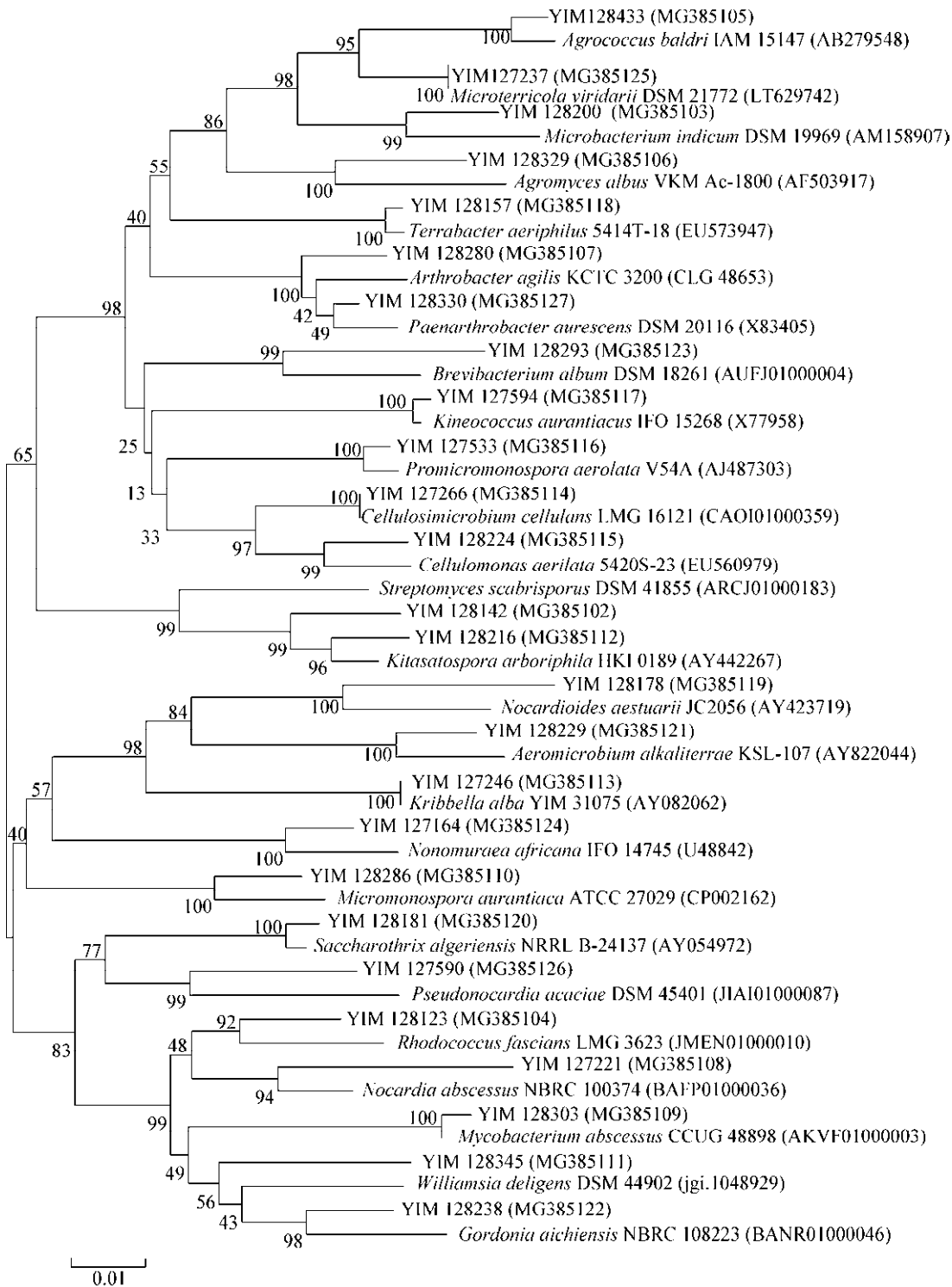


图 4 基于 16S rRNA 基因序列以邻位连接法构建分离所得菌株在属水平上的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree constructed by using the Neighbor-Joining method based on the 16S rRNA gene sequences of isolated strains on genus level

注: 计算结果大于 50% 的自举值显示在分支上, 0.01 代表两个核苷酸之间的遗传距离。

Note: Numbers at branch points refer to bootstrap percentages based on 1 000 replicates (only values above 50% are indicated). Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

2.3.2 各培养基的筛选结果

所用 9 种培养基碳氮源各异, 无机盐成分不尽相同。通过使用多种培养基对样品进行放线菌分离培养, 不仅可以筛选到最适于所选样品的培养基, 更能够全面了解样品各分类水平上的放线菌群落结构组成。

本研究共获得放线菌 351 株。由图 5 可知, 在 9 种培养基中, M1 培养基(即 YIM 171)分离得到的菌株数目最多, 达到 151 株, 占总数的 43%。M2、M6、M7 所分离到的菌株数目分别占总数的 9%、10%、9%, 其余培养基的分离效果并不理想。图 6 比较了各培养基在不同样品中的分离情况, M1 培养基在各样品中均分离到相对较多数目的菌株, 在 BB、BH、S-G 样品中分离到的放线菌菌株比例分别达到了 70%、42%、50%。

结合图 7 和表 4, 利用 M1 培养基共分离到 21 个属, 其中有 6 个属在其他培养基中没有分离到。M5、M6、M7 培养基的分离效果不错, 分别得到 10、9、9 个属, 各有 3、1、1 个属在其余培养基中没有得到。而其余培养基分离效果一般。综上所述, M1 培养基在所试 9 个培养基中效果最优, 不仅分离到的放线菌菌株数目多, 而且属水平上多样性程度高。

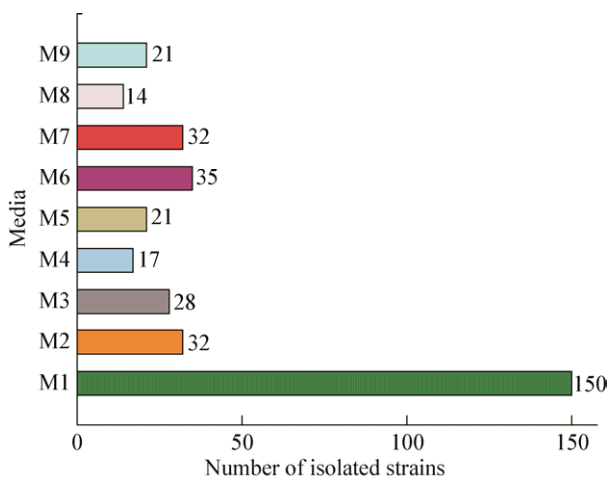


图 5 各培养基所分离菌株

Figure 5 The number of isolated strains in each medium

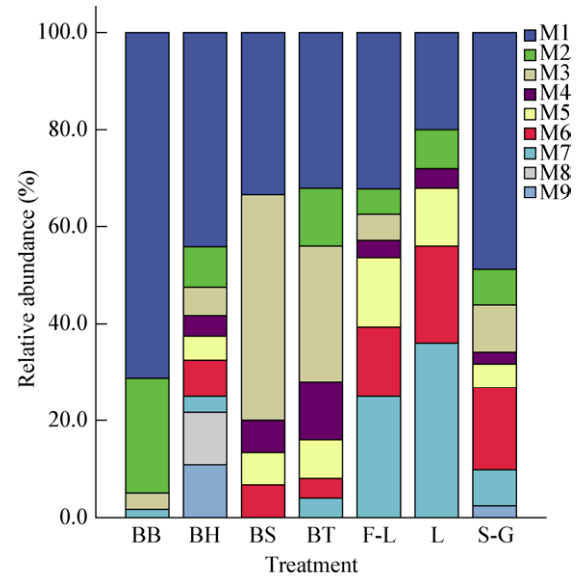


图 6 各培养基在不同样品间的分离情况

Figure 6 The isolation results of different samples in each medium

2.3.3 各样品纯培养放线菌多样性的比较

统计各样品在属水平上分离所得放线菌菌株的数目, 并比较各样品的放线菌纯培养多样性情况, 结果见图 8。由图 8 可知, 7 个样品中来自丙中洛样点的 4 个样品普遍分离效果较好, 尤其是 BH 样品分离所得菌株数目最多, 达到 119 株, 占 34%; BB 样品次之, 分离到 62 株, 占 18%; 而 S-G、F-L、L 样品则稍逊于丙中洛样点, 分别分离到 47 株 (13%)、56 株 (16%)、28 株 (8%)。

结合图 9 和表 5 可知, BH 样品的放线菌多样性最好, 共分离得到 17 个属, 其中 4 个属是其他样品中没有分离到的。BB、F-L、L 样品多样性情况次之, 这 3 个样品都分离得到 10 个属, L 样品中有 4 个属在其他样品中没有被检测到。其余样品的多样性情况一般。链霉菌属 (*Streptomyces*) 在各样品中所占比例在 30%–65% 之间, 为优势菌群。红球菌属 (*Rhodococcus*) 在 BB、BT、BS、BH、F-L 样品中所占比例也比较高, 达到 15%–20%。在 BS、F-L、L 样品中能够分离得到 20% 左右的微杆菌属 (*Microbacterium*)。节杆菌属 (*Arthrobacter*) 在 F-L、L 样品中分别占 22% 和 14% 左右, 在其他样品中未检测到较高的丰度。而其他放线菌属, 如诺卡氏菌

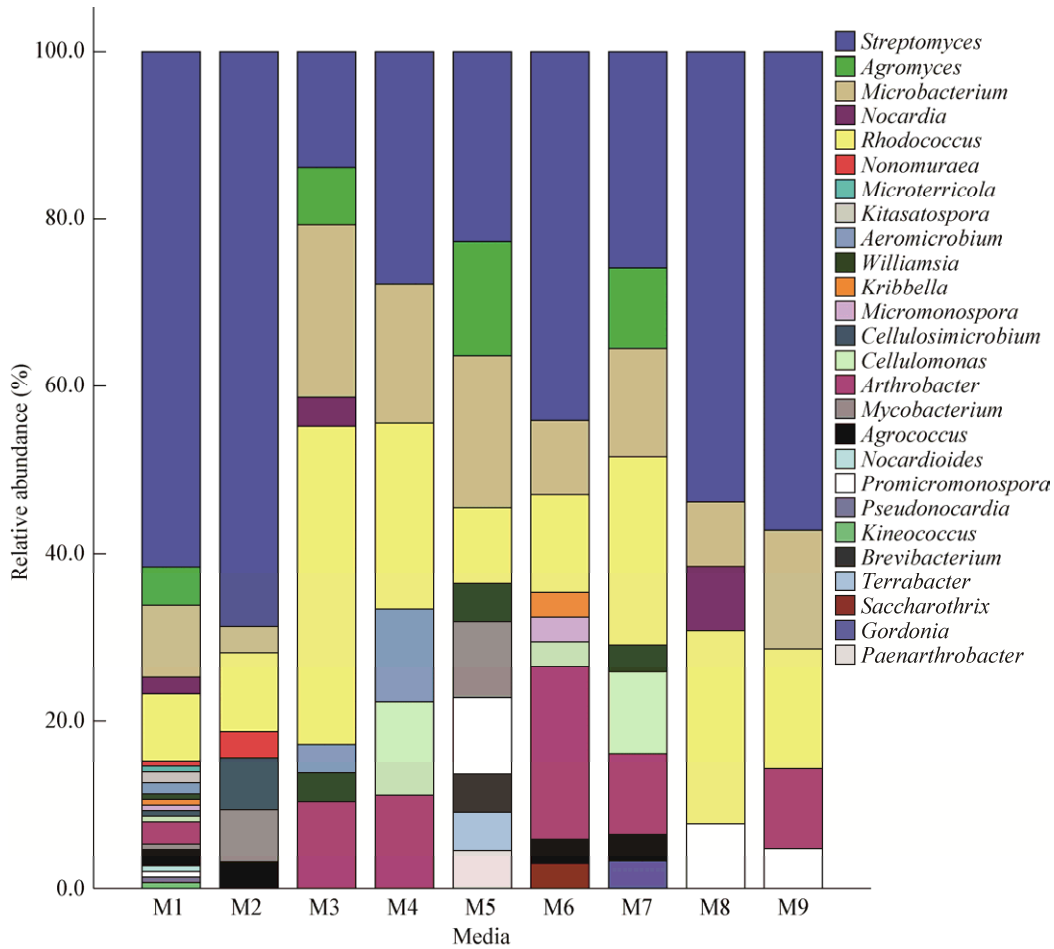


图 7 属水平上各培养基分离的相对丰度图

Figure 7 The relative abundance results isolated from nine media on genus level

表 4 属水平上各培养基分离情况

Table 4 The isolation result of different media on genus level

培养基 Media	所分离得到的属 Isolated genus
M1	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Aeromicrobium</i> , <i>Williamsia</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Microterricola</i> , <i>Kitasatospora</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Nocardioidea</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Kineococcus</i>
M2	<i>Streptomyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Agrococcus</i>
M3	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Aeromicrobium</i> , <i>Williamsia</i> , <i>Arthrobacter</i>
M4	<i>Streptomyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Aeromicrobium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Arthrobacter</i>
M5	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Williamsia</i> , <i>Terrabacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Paenarthrobacter</i>
M6	<i>Streptomyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Saccharothrix</i>
M7	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Williamsia</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Gordonia</i>
M8	<i>Streptomyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Promicromonospora</i>
M9	<i>Streptomyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Promicromonospora</i>

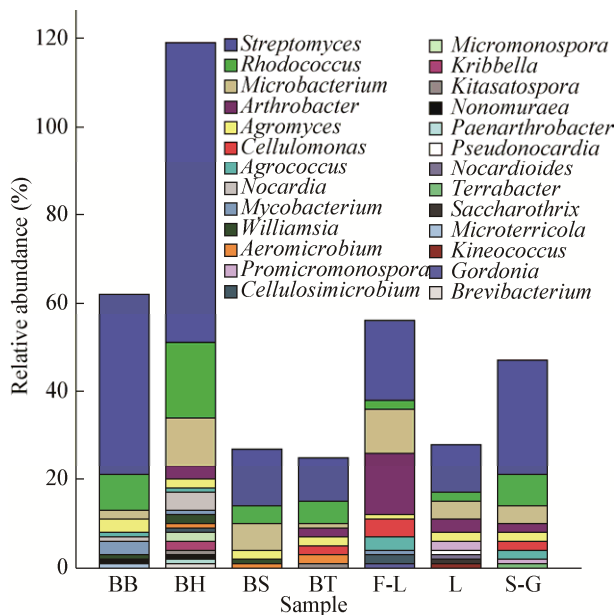


图 8 属水平上由不同样品所分离得到菌株数目
Figure 8 The number of the strains isolated from each sample on genus level

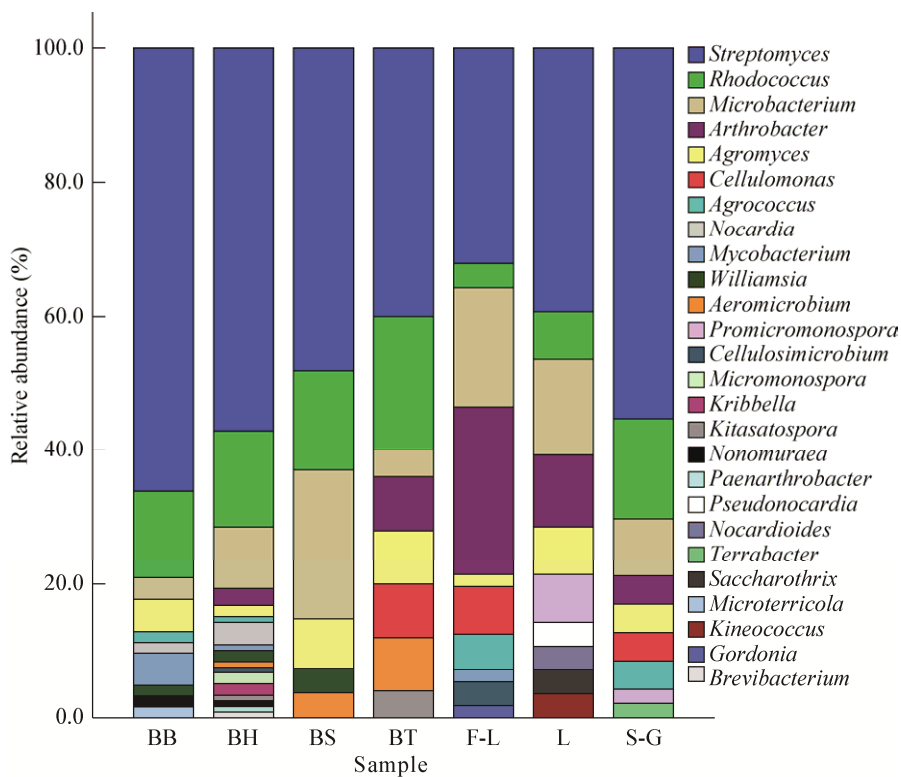


图 9 属水平上各样品分离放线菌的相对丰度图
Figure 9 Relative abundance of the isolated actinomyces in different samples

属(*Nocardia*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、纤维素菌属(*Cellulomonas*)及威廉姆萨菌属(*Williamsia*)等在各样品中的丰度较低,属于劣势菌群。

2.3.4 放线菌属水平上高通量测序与纯培养结果的比较

(1) 两种方法检测到属数目的总体比较

比较结果表明,通过纯培养得到的属有 10 个在高通量测序方法中没有被检测到,而高通量测序中有 64 个属没有在纯培养方法中分离到,两者都有的属达到 16 个。

(2) 两种方法在各样品中检测到的属数目的比较

由图 10 和表 6 可知,虽然高通量测序所得结果属水平上在各样品中都要高于纯培养分离所得属的数量,但大体上可以看出两种方法所得结果的差异。在纯培养结果中, BH 样品的放线菌多样性属于多样性最好的一个样品,除丙中洛样点 4 个样品外的其他 3 个样品则表现一般。在高通量测序结

表 5 各样品分离结果在属水平上的分布

Table 5 The isolated results of different sample on genus level

样品 Sample	所分离得到的属 Isolated genus
BB	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Williamsia</i> , <i>Microterricola</i>
BT	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Kitasatospora</i> , <i>Aeromicrobium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Cellulomonas</i>
BS	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Williamsia</i> , <i>Aeromicrobium</i>
BH	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Williamsia</i> , <i>Kitasatospora</i> , <i>Aeromicrobium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Paenarthrobacter</i>
S-G	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Terrabacter</i>
F-L	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Gordonia</i>
L	<i>Streptomyces</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Nocardioidea</i> , <i>Saccharothrix</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Kineococcus</i>

果中, 丙中洛的 4 个样品则在高通量结果中表现较差, 而 S-G、F-L、L 这 3 个样品的放线菌多样性相对较好。总的来说, 这两种方法所得结果在整体上所呈现出的趋势不一致。

3 讨论与结论

近些年来, 微生物药物的开发和利用势头略显疲软, 原因是发现新的有较好生物活性的微生物次

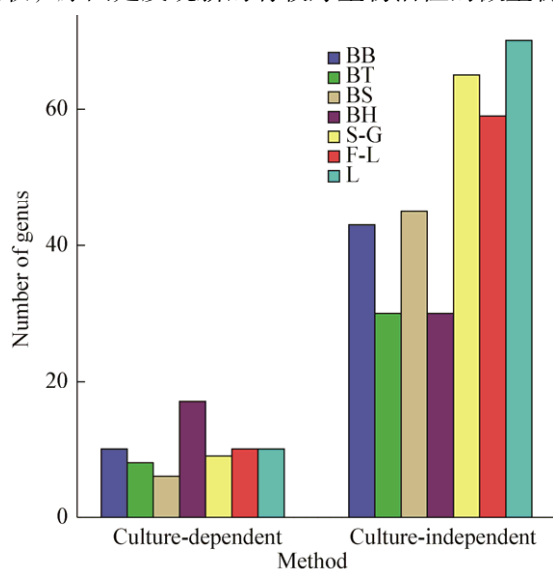


图 10 两种方法在各样品中检测到的属数目的比较

Figure 10 The difference between cultured and uncultured results on genus level

生代谢产物需要耗费大量人力物力, 而传统的链霉菌属已被反复研究。所以从一些相对新颖的样品来源中分离出未被研究且有高利用价值的放线菌菌株就显得尤为重要。土壤环境样品一直是放线菌资源的“宝库”, 虽然它易于获得且被大量研究, 但土壤环境在全球范围内分布广泛、形式多样、理化性质各异, 还有很多未知的土壤环境样品没有被研究。本研究所选取的怒江大峡谷怒江州段气候多样、地貌独特、动植物多样性较高, 且在土壤放线菌资源方面没有报道, 应该予以重视。相比于曹艳茹等^[27-28]、Kumar 等^[29]之前所做的类似工作, 本研究优势在于所用土壤样品来源更加特殊, 受人为影响程度更小; 而且本研究所用方法更加全面, 包括了免培养和纯培养两个方面的放线菌多样性, 并结合土壤理化因子对结果进行了初步分析, 本研究对于进一步丰富以及拓展此方面的研究有一定作用和借鉴意义。

通过高通量测序方法对怒江州段 7 个样品的放线菌免培养多样性进行研究。具体到放线菌门下, 测序共检测到 9 个纲 21 个目 53 个科 80 个属。利用多种分析方法对不同样品中放线菌组成结构及其相似性进行了研究。BB、BT、BH 3 个样品有相

表 6 高通量与纯培养结果在属水平上的比较

Table 6 Comparison between cultured and uncultured results on genus level

Culture-dependent	Shared	Culture-independent
<i>Kineococcus</i>	<i>Williamsia</i>	<i>Marmoricola</i> , <i>Amnibacterium</i> , <i>Hilus</i> , <i>Rhizocola</i> , <i>Oryzihumus</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Iamia</i> ,
<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Pseudonocardia</i>	Unidentified_Coriobacteriaceae, <i>Frankia</i> , <i>Conexibacter</i> ; <i>Actinocorallia</i> ,
<i>Agrococcus</i>	<i>Kribbella</i>	<i>Sporichthya</i> , CL500-29_marine_group, <i>Catenulispora</i> , <i>Actinoallomurus</i> ,
<i>Cellulomonas</i>	<i>Promicromonospora</i>	<i>Microclunatus</i> , <i>Flaviflexus</i> , <i>Friedmanniella</i> , <i>Corynebacterium_1</i> , <i>Olsenella</i> , <i>Slackia</i> ,
<i>Micromonospora</i>	<i>Aeromicrobium</i>	<i>Brachybacterium</i> , <i>Leucobacter</i> , <i>Collinsella</i> , <i>Smaragdicooccus</i> , <i>Modestobacter</i> ,
<i>Microterricola</i>	<i>Saccharothrix</i>	<i>Actinospica</i> , <i>Solirubrobacter</i> , <i>Enterorhabdus</i> , <i>Lechevalieria</i> , <i>Bifidobacterium</i> ,
<i>Gordonia</i>	<i>Bryobacterium</i>	<i>Actinocatenispora</i> , <i>Crossiella</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Senegalimassilia</i> ,
<i>Nonomuraea</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Candidatus_Planktophila</i> , <i>Aciditerrimonas</i> , <i>Glycomyces</i> , <i>Nakamurella</i> ,
<i>Paenarthrobacter</i>	<i>Nocardioides</i>	<i>Angustibacter</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Sanguibacter</i> , <i>Flexivirga</i> , hgcI_clade, <i>Luedemannella</i> ,
<i>Kitasatospora</i>	<i>Agromyces</i>	<i>Acidothermus</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Patulibacter</i> , <i>Illumatobacter</i> , <i>Metascardovia</i> ,
	<i>Terrabacter</i>	<i>Candidatus_Microthrix</i> , <i>Geodermatop</i> , <i>Actinophytocola</i> , <i>Gaiella</i> ,
	<i>Rhodococcus</i>	<i>Sinomonaseuzebya</i> , <i>Jatrophihabitans</i> , <i>Phytomonospora</i> , <i>Amycolatopsis</i> ,
	<i>Nocardia</i>	<i>Blastococcus</i> , Unidentified_Gaiellales, <i>Actinomycetospora</i> ,
	<i>Microbacterium</i>	Unidentified_Acidimicrobiales, <i>Coriobacteriaceae_UCG-003</i>
	<i>Streptomyces</i>	
	<i>Arthrobacter</i>	

似的放线菌群落结构, BS、F-L、S-G 的放线菌群落结构相似, 而 L 样品则与其他样品相差较大。BS、F-L、S-G、L 样品的放线菌丰度显著高于其余 3 个样品。结合各样品的土壤理化指标可以推论, 在免培养方面, 不仅仅是水分和有机质丰富的中性土壤样品中有大量的放线菌存在, 沙质的偏碱性干燥土壤中同样可以检测到十分丰富的放线菌资源, 甚至在一定程度上超过前者。

通过尝试不同的预处理方法、不同的抑制剂及其浓度以及多种培养基, 得到了最适合怒江州段土壤样品的分离方法, 并对样品中放线菌菌株进行分离、培养及鉴定。共获得 351 株放线菌, 分布于放线菌纲下 8 个目 14 个科 26 个属。所用 9 种培养基中, YIM171 的分离效果最好。通过比较不同样品的放线菌纯培养多样性, 丙中洛混合样明显优于其他样品。通过对各个样品所分离放线菌菌株数目和属水平上分布情况的研究, 结果表明丙中洛样点的各样品多样性普遍优于其余样点, 尤其是丙中洛混合样, 其放线菌纯培养多样性明显最好。结合土壤理化因子分析, 可能是由于丙中洛样点(除了 BS 样品)相比于其余样点来说, 有机质和水分比例较大, 土质中性偏酸, 较适合其中某一部分放线菌生存, 如链霉菌属(*Streptomyces*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、

微杆菌属(*Microbacterium*)等, 并且它们也较容易通过常规分离方法获得。当然, 这些结果的获得也与培养基的选用有一定关系, 分析可能此次选用的大多数培养基的成分有利于分离来自营养丰富的土壤环境的放线菌, 导致了丙中洛样点的放线菌纯培养多样性明显好于其他样点。其中 BH 样品为混合土样, 综合了丙中洛样点各样品的土壤特点, 使放线菌群落更加丰富。而其余样点土样性质较干燥贫瘠, 所用 9 种培养基的分离效果并不十分理想, 推测这些培养基不适用于此种土壤理化性质的样品的放线菌分离。所以今后应进一步筛选培养基和设计放线菌分离方法来更加深入全面地探明此区域的土壤放线菌纯培养多样性情况。

本研究利用高通量测序分析和纯培养分离鉴定两种方法, 对怒江峡谷怒江州段各土壤样品的放线菌多样性有了较为深入的了解。但初步比较结果发现, 两种方法在样品间所呈现出的多样性情况有较大差别。高通量测序和纯培养分离方法属于截然不同的两种手段, 他们都存在着一定的局限性和选择性。

Sun 等^[30]认为在 16S rRNA 基因中存在着基因内异质性, 即 16S rRNA 基因的多样性, 这种现象会导致在一定程度上对于样品中细菌多样性

的高估; 该文还指出, 以 16S rRNA 基因的 V1 和 V6 区域设计引物会最大程度上高估多样性, 从而使结果不准确; 而使用 V4-V5 区域设计引物则会将这种偏差降到最小程度, 可以得到较为令人信服的结果。结合本研究结果, 高通量测序部分使用 16S rRNA 基因 V3-V4 区域设计引物, 部分符合上述研究理论, 即包含 V4 区域, 在放线菌多样性结果方面还是相对稳定可信的。我们认为, 导致结果中高通量测序与纯培养数据在样品之间显示出不一致性的主要原因在于高通量测序中采用分子生物学的方法提取土壤总 DNA, 而较贫瘠、土质为沙质的土壤样品由于土壤颗粒结构简单且之间的空隙较大, 更利于各微生物类群的解离和遗传物质的释放, 从而有利于其环境基因组 DNA 的提取。土壤有机质和水分含量丰富、土壤结构较为复杂的土样则相对处于劣势。在利用特异性引物对处理后的环境样品基因组 16S rRNA 基因的 V3-V4 区进行扩增过程中, 由于扩增引物和扩增条件的选择、模板序列的不同特点造成扩增过程具有一定的偏好性, 环境基因组中易于扩增的优势微生物会被大量扩增出来, 相对来说抑制了其他不易扩增微生物的检出。

对于纯培养方法来说, 由于实验工作量等实际问题, 只能基于原先经验或是预实验基础来利用有限的培养基或分离方法进行实验, 不可能对非常多的培养基或预处理方法组合进行实验, 所以普通的平板分离方法更像是一种对放线菌的选择性分离方法。这就造成通过纯培养分离方法所展示出的多样性结果较好的样品必然是适合于所用的大部分培养基的, 而所表现出的多样性情况较差的样品可能是由于不适合使用本实验中所用的培养基成分或预处理方法。这种同一样品在不同检测方法中结果不一致的现象是比较正常的, 但为了更为全面地研究样品的放线菌多样性情况, 在纯培养方面应该根据现有的结果尝试更多的分离方法和培养基成分, 尤其是不能忽视营养贫瘠的沙质土, 本研究充分表明了这种土壤中虽然水分和有机质含量较低,

但同样蕴含着不容小觑的放线菌资源。在高通量测序方面, 一方面是利用新的测序平台进行检测, 另一方面由于测序过程交由公司完成, 研究者们能做的是选择不同的环境基因组提取方法以适应于不同的样品状况, 尽量全面地还原样品群落组成情况。

REFERENCES

- [1] Liu YW. Beautiful Nujiang Grand Canyon[J]. Earth, 2007(1): 29-30 (in Chinese)
刘扬武. 奇丽多姿的怒江峡谷[J]. 地球, 2007(1): 29-30
- [2] Bao GJ. Study on ecological impact of hydropower development of Nujiang River Basin: a case study of Nujiang Prefecture part[J]. Yangtze River, 2011, 42(7): 91-94 (in Chinese)
包广静. 怒江流域怒江州段水电开发生态影响研究[J]. 人民长江, 2011, 42(7): 91-94
- [3] Lin SW, Wu RD. The spatial pattern of soil retention ecosystem service in the Three Parallel Rivers Region[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2015, 37(2): 295-302 (in Chinese)
林世伟, 武瑞东. “三江并流”区生态系统土壤保持服务的空间分布特征[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2015, 37(2): 295-302
- [4] Yuan EP, Wang L. Discussion on the value of original ecology in village Wuli, Nujiang Prefecture, Yunnan[J]. Journal of Southwest University for Nationalities (Humanities & Social Sciences Edition), 2012, 33(1): 41-44 (in Chinese)
袁恩培, 王莉. 论云南贡山怒江地区雾里村原生态景观价值[J]. 西南民族大学学报: 人文社科版, 2012, 33(1): 41-44
- [5] Zou XP, Qi QW, Xu ZR, et al. Analysis of land use/cover changes and its landscape ecological effects in Nujiang Watershed[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2005, 19(5): 147-151 (in Chinese)
邹秀萍, 齐清文, 徐增让, 等. 怒江流域土地利用/覆被变化及其景观生态效应分析[J]. 水土保持学报, 2005, 19(5): 147-151
- [6] Liu DY, Shen YZ, Wang ZX. Analysis of water resources characteristics of the Nujiang River Basin[J]. Yangtze River, 2008, 39(17): 64-66 (in Chinese)
刘冬英, 沈燕舟, 王政祥. 怒江流域水资源特性分析[J]. 人民长江, 2008, 39(17): 64-66
- [7] Xu Y, Li P, Liu Y, et al. Spatial patterns and determinants of species richness of alien and native plants in the Nujiang River valley[J]. Biodiversity Science, 2016, 24(4): 389-398 (in Chinese)

- 许玥, 李鹏, 刘晔, 等. 怒江河谷入侵植物与乡土植物丰富度的分布格局与影响因子[J]. 生物多样性, 2016, 24(4): 389-398
- [8] Li X, Li FL, Liu K, et al. Morphologic differentiation and taxonomic status of *Pseudecheneis* (Siluriformes: Sisoridae) from Irrawaddy and Salween Drainages, China[J]. Zoological Research, 2008, 29(1): 83-88 (in Chinese)
李旭, 李凤莲, 刘恺, 等. 中国伊洛瓦底江和怒江褶鲃属鱼类的形态差异及分类地位[J]. 动物学研究, 2008, 29(1): 83-88
- [9] Cao YR. Diversity of the culturable *Actinomycetes* isolated from forest soil in southwest of China[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2009 (in Chinese)
曹艳茹. 西南部分地区森林土壤可培养放线菌多样性研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2009
- [10] Jiang Y, Chen X, Cao YR, et al. Diversity of cultivable actinomycetes in tropical rainy forest of Xishuangbanna, China[J]. Open Journal of Soil Science, 2013, 3(1): 9-14
- [11] He JQ, Yue HM, Zhang GJ. Diversity and bioactivity analysis of actinomycetes isolated from Cibagou Nature Reserve soil[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2010, 38(8): 83-89 (in Chinese)
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
- [12] Gao T. The study on biodiversity, temporal and spatial distribution of soil microorganism in desert steppe of Ningxia[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agriculture University, 2006 (in Chinese)
高婷. 宁夏荒漠草原土壤微生物多样性及其时空分布[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2006
- [13] Tiwari K, Upadhyay DJ, Mösker E, et al. Culturable bioactive actinomycetes from the Great Indian Thar Desert[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(4): 1901-1914
- [14] Dong YP, Guo L, Xugela Habden, et al. Study on diversity and bioactivity of actinomycetes isolated from the south edge of the Taklamakan Desert[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(4): 241-247 (in Chinese)
董艳萍, 郭琳, 旭格拉·哈布丁, 等. 塔克拉玛干沙漠南麓土壤放线菌资源勘探及抗菌活性筛选[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(4): 241-247
- [15] He JQ, Wu YF, Zhang GJ. Activity and ecological distribution of actinomycetes from soil in the southeastern of Tibet[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(5): 773-777 (in Chinese)
何建清, 吴云锋, 张格杰. 藏东南地区土壤放线菌的生态分布及活性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 773-777
- [16] Ma AA. Phylogenetic and physiological diversity of actinomycetes isolated from different habitats in Qinghai-Tibet plateau[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University, 2012 (in Chinese)
马爱爱. 青藏高原不同生境土壤放线菌多样性及生理活性研究[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2012
- [17] He JQ, Zhang GJ, Yue HM. Study on ecological distribution and antimicrobial activity of actinomycete from soil in the Mt. Everest national nature preserve[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(32): 18162-18165 (in Chinese)
何建清, 张格杰, 岳海梅. 珠穆朗玛峰自然保护区土壤放线菌的生态分布及拮抗性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(32): 18162-18165
- [18] Zheng YK. Diversity of actinobacteria from the Qinghai-Tibet Plateau and their biocontrol potential for pathogens of root rot disease of *Panax notoginseng*[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2015 (in Chinese)
郑有坤. 青藏高原土壤放线菌的多样性及其对三七根腐病的生防潜力[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2015
- [19] Jin ZZ, Lei JQ, Li SY, et al. Soil microbial diversity, site conditions, shelter forest land, saline water drip-irrigation, drift desert[J]. Journal of Basic Microbiology, 2013, 53(10): 856-867
- [20] Carvalhais LC, Dennis PG, Fan B, et al. Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68555
- [21] Morgan JA, Bending GD, White PJ. Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(417): 1729-1739
- [22] Silva-Lacerda GR, Santana RCF, Vicalvi-Costa MCV, et al. Antimicrobial potential of actinobacteria isolated from the rhizosphere of the Caatinga biome plant *Caesalpinia pyramidalis* Tul.[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 15(1): 15017488
- [23] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites: a personal view[J]. Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1-26
- [24] Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochem Bull, 1987, 19(1): 11-15
- [25] Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples[J]. Letters in Applied Microbiology, 2001, 33(1): 17-20
- [26] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874
- [27] Cao YR, Jiang Y, Xu LH. Diversity and bioactivity analysis of actinomycetes isolated from Grand Shangri-La soil[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009, 49(1): 105-109 (in Chinese)
曹艳茹, 姜怡, 徐丽华. 大香格里拉土壤放线菌组成分析及生物活性测定[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 105-109
- [28] Cao YR, Jiang Y, Wang Q, et al. Diversity and bioactivity of cultured actinomycetes in Sichuan and Yunnan area[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(8): 995-1000 (in Chinese)
曹艳茹, 姜怡, 王茜, 等. 川滇四区森林土壤纯培养放线菌多样性及生物活性[J]. 微生物学报, 2010, 50(8): 995-1000

[29] Kumar V, Bisht GS, Gusain O. Terrestrial actinomycetes from diverse locations of Uttarakhand, India: Isolation and screening for their antibacterial activity[J]. Iranian Journal of Microbiology, 2013, 5(3): 299-308

[30] Sun DL, Jiang X, Wu QL, et al. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(19): 5962-5969

2018年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-1)

序号	会议名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	首届病毒基因组生物信息学培训班	中国微生物学会病毒学专业委员会	1月12-14日	40	山东泰安	吴莹
2	2018年全国重症休克与脓毒症学术会议	中国微生物学会微生物毒素专业委员会	3月9-11日	700	广东广州	刘志锋 13711598120
3	特殊病原菌检测论坛	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	3月17-18日	100	重庆	沈定霞 13911861076
4	全国感染免疫高峰论坛及第五届四川临床微生物学术会议	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	4月14日	50	四川江油	刘诗颖
5	21世纪第六届人兽共患病病原学学术研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	4月	150	湖南岳阳	蒋毅
6	高等级病原实验室生物安全培训	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	4月	150	北京	贾晓娟 010-64806013
7	病原微生物检测技术和产业发展论坛暨生物安全培训会议	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	5月	500	北京	贾晓娟 010-64806013
8	第十二届中日病毒学会议	中国微生物学会病毒学专业委员会	5月	300	湖北武汉	吴莹
9	The 2nd International Conference "Insects to feed the world"	中国微生物学会农业微生物学专业委员会	5月	400	湖北武汉	蔡珉敏 cmm114@mail.hzau.edu.cn
10	微生物与感染诊断学习班	中国微生物学会临床微生物学专业委员会	5月18日	50	陕西西安	赵雅
11	第二届中国生物诊断高峰论坛	中国微生物学会生物制品专业委员会	6月	500	待定	毛群颖 18810054059
12	中日韩酱业论坛	中国微生物学会酿造分会	6月8日	150	河北保定	鲁绯
13	第七届地质微生物学研讨会	中国微生物学会地质微生物学专业委员会	6月7-9日	400	上海	侯卫国 18210227195
14	第九届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6月	700	内蒙古海拉尔	吕相征 13693022236
15	中-日-韩酶工程学术会议	中国微生物学会酶工程专业委员会	6月30日-7月2日	200	日本京都	欧阳浩森 010-64807420
16	2018年全国微生物与人体健康学术研讨会	中国微生物学会医学微生物学与免疫学专业委员会	7月	200	内蒙古呼和浩特	饶贤才, 石艳春 15223315285