

满百膺,程晓钰,王红梅,等.湖北清江和尚洞风化岩壁放线菌分离及基于 16S rRNA 的种类分析[J].中国岩溶,2017,36(4):572-579.

DOI:10.11932/karst20170420

湖北清江和尚洞风化岩壁放线菌分离 及基于 16S rRNA 的种类分析

满百膺^{1,2},程晓钰¹,王红梅^{1,2},云媛^{1,2},钟宇洪¹

(1.中国地质大学 环境学院,湖北 武汉 430074;

2.中国地质大学 生物地质与环境地质国家重点实验室,湖北 武汉 430074)

摘 要:为探究湖北清江和尚洞岩壁放线菌物种组成及其与碳酸盐岩相互作用的关系,分别采集该洞穴无光区风化岩壁样品 2 份(W1 和 W2)和弱光区风化岩壁样品 1 份(W3),采用经改良的 5 种已知放线菌分离培养基及 1 种自主设计的风化岩壁浸汁培养基两种策略优化设计分离培养基。采用稀释涂布法分离放线菌,并选择放线菌特异引物进行 16S rRNA 基因扩增和序列测定并构建系统发育树。结果表明,从 3 份风化岩壁样品中共纯化到放线菌 72 株,分属于放线菌纲(Actinobacteria)的 4 个属:链霉菌属(*Streptomyces*, 69 株)、红球菌属(*Rhodococcus*, 1 株)、冢村氏菌属(*Tsukamurella*, 1 株)和微杆菌属(*Microbacterium*, 1 株),其中链霉菌属为优势菌属。无光区样品 W1 和 W2 分离到菌株较少,分别为 9 株和 10 株,而弱光区样品 W3 分离到菌株较多,为 53 株。研究结果为进一步研究放线菌与洞穴碳酸盐矿物相互作用的潜在关系奠定了基础。

关键词:和尚洞;风化岩壁;放线菌;纯培养;16S rRNA

中图分类号:Q938

文献标识码:A

文章编号:1001-4810(2017)04-0572-08

0 引 言

碳酸盐岩是大型岩溶洞穴发育的物质基础,全球碳酸盐岩的出露面积约占陆地面积的 12%^[1],而全球面积最大的碳酸盐岩分布区位于中国秦岭—淮河以南地区,面积达 5×10^5 km²,使我国成为世界上洞穴资源最为丰富的国家^[1-2]。洞穴是岩溶地区长期地质活动形成的封闭或半封闭的地下岩溶形态,具有较高 CO₂ 浓度、黑暗无光、营养贫瘠、温度较低、湿度接近饱和、生境不连续且受到物理条件制约,保持几千年不变等生境特征,被认为是陆地黑暗生态系统的一种极端环境^[3]。岩溶洞穴一般地处偏远且难以到

达,受人类活动的干扰较少,基本保持自然状态,能够对微生物群落进行长期保存^[4],常被作为研究洞穴微生物的天然实验室。岩溶洞穴长期被作为地质学及全球气候变化研究的载体,但对洞穴微生物多样性及其环境效应的研究。

随着地球微生物学研究的兴起,使无光、富钙偏碱且贫营养的岩溶洞穴脆弱的生态系统中主要的生产者和分解者—洞穴微生物,越来越受到重视并成为国际洞穴研究的前沿热点^[5-7]。目前,国内鲜见有关喀斯特洞穴微生物群落组成的研究报道,尽管对喀斯特地区土壤^[8-9]、水环境^[10-12]及双河洞^[13]、神仙洞^[14]、腾龙洞及龙骨洞^[15]等部分岩溶洞穴土壤放线

基金项目:国家自然科学基金重点基金(41130207)

第一作者简介:满百膺(1979—),男,讲师,在读博士生。研究方向:地质微生物。E-mail:shmilying@126.com。

通信作者:王红梅(1970—),女,理学博士,教授、博士生导师,主要从事微生物—矿物相互作用的环境效应以及微生物对全球变化的响应等教学和科研工作。E-mail:wanghemei04@163.com。

收稿日期:2016-09-15

菌多样性及新抗生素的挖掘方面做了一些工作,但是相对于其它环境而言,洞穴微生物的研究依然薄弱。近年来,微生物与矿物相互作用的研究在地球微生物学领域蓬勃发展,随着对原始洞穴沉积物中微生物沉积作用的揭示^[16]以及洞穴微生物与矿物相互作用对传统地质学问题的解译^[17-18],岩溶洞穴生境中微生物多样性及其与矿物相互作用的研究正受到越来越多研究人员,特别是地学研究者的关注。放线菌不仅是陆地复杂有机复合物的降解者,也是一些天然洞穴的先锋菌群,如在西班牙的 Altamira^[19]及美国的 Carlsbad Cavern^[20]洞穴、斯洛文尼亚的 Pajsarjeva jama^[21]及西班牙的 Llonin^[22]洞穴,放线菌分别为洞穴岩壁细菌中的第一及第二大分类群。27 亿年的进化历史^[23]使其对寡营养条件具有很强的适应能力,在洞穴主要元素生物地球化学循环、矿物形成及转化等方面具有重要贡献,如通过呼吸作用氧化还原花岗岩中 Cu、Fe 和 Zn 等金属元素并加速释放^[24]、破坏黑云母层状结构^[25]及产生有机酸腐蚀岩石^[26]以加速矿物风化;也可以通过生理代谢活动诱导沉淀碳酸盐矿物^[18],深刻影响放线菌栖息表层环境的矿物特征。虽然岩溶洞穴碳酸盐岩相对丰富,洞穴岩壁环境中放线菌亦占主导类群,但是该环境中放线菌主要物种组成及其与碳酸盐互作的潜在关系尚无相关研究报告,亟需微生物学及地质学工作者的联合及深入研究。

和尚洞是位于湖北省清江流域的一个水平喀斯特洞穴,本研究组目前已对该洞细菌多样性^[27-29]、细菌与矿物作用^[30-31]、滴水微生物群落^[28]及真菌多样性^[32]做了相关工作。为探究和尚洞岩壁放线菌与碳酸盐岩互作的潜在关系,于 2015 年 8 月采集洞内风化岩壁样品,开展了风化岩壁可培养放线菌分离及其物种组成分析的初步研究,为进一步开展放线菌与洞穴碳酸盐矿物互作关系提供实验材料,本文是对该研究方法及其结果的初步报道。

1 材料与仪器

1.1 研究区概况

和尚洞是一个由寒武纪白云岩发育而来的水平喀斯特洞穴,位于湖北省宜昌市长阳县鱼峡口镇招徕河村的半峡,地理位置为 30°27'N,110°25'E。清江是长江的一级支流,该流域地处亚热带,属季风性山地

湿润气候,年均降水 1 400 mm^[33],岩溶地貌发育,地下溶洞较多^[34]。和尚洞嵌入陡峭的清江南岸,距清江河面高度约 30 m,只能乘船抵达,极少有人类活动,基本处于自然状态。其入口单一,长约 250 m,高约 20 m,宽约 25 m,年平均温度为 16~18 °C^[35]。

1.2 样品采集

2015 年 8 月在和尚洞选取 3 个合适的采样点: W1、W2(无光区)和 W3(弱光区)(图 1),按照五点采样法,用灭菌刮刀刮取表层(< 1 cm)风化岩壁样品,于无菌自封袋混匀后,分装至 50 mL 无菌离心管。每个样点采集 3 个风化岩壁样品(相隔 3 m)。将样品标记后置于 4 °C 保温箱中于 24 h 内带回实验室,无菌研磨并过 200 目筛,保存于 4 °C 冰箱备用。

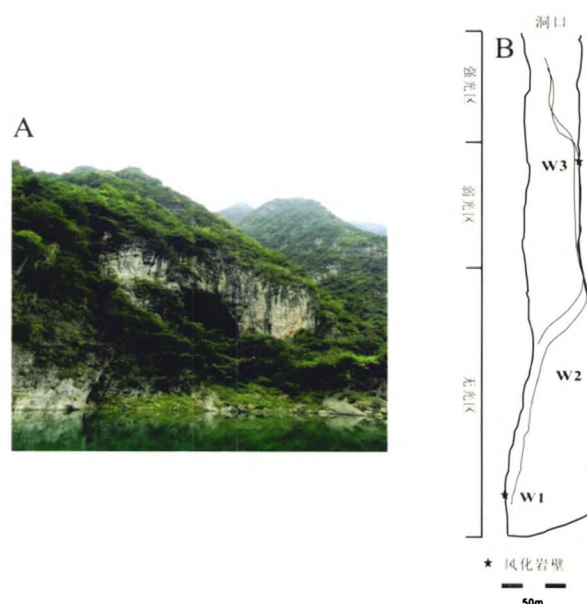


图1 和尚洞位置及采样点示意图(A:洞口直观图,B:和尚洞示意图及风化岩壁采样点,引自^[32])

Fig 1 The location of Heshang Cave and sampling sites (A:Outside view of Heshang Cave, B:Schematic diagram of Heshang Cave and the sampling sites of weathered rocks;after^[32])

1.3 培养基

1.3.1 分离培养基

依据洞穴贫营养条件及 Ca^{2+} 可促进放线菌孢子萌发的特点^[36],选择 6 种含钙的固体分离培养基,其中 5 种培养基:Pridham agar(PA)^[37]、海藻糖-脯氨酸培养基(HP)^[36]、改良高氏二号培养基(GG2)^[36]、高氏一号琼脂培养基(G1)^[38]和 GW1 琼脂培养基(GW1)^[39]根据文献进行了改良,除琼脂和去离子水

外,其它配方中组分均减半。另外一种培养基是模拟洞穴岩壁环境条件,自主设计的风化岩壁浸汁琼脂培养基,具体配置方法如下:经无菌研磨的 175 g 风化岩壁混合样均匀分装至 2 个 1 L 三角瓶,各加 500 mL 去离子水,混匀后置于恒温摇床内 150 r/min,振荡 30 min。风化岩壁悬液于 121 °C 灭菌 20 min 后取上清液,补足去离子水至 1 000 mL,加琼脂 20 g 备用。将上述培养基 pH 调整为 7.8,加入重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)抑制真菌和细菌(每 1 L 培养基加 1.70×10^{-4} mol/L 重铬酸钾 100 mL),于 121 °C 灭菌 20 min 后制板备用。

1.3.2 纯化培养基

分离获得的放线菌菌株采用高氏一号琼脂培养基^[38]进行纯化。

1.4 主要试剂及仪器

培养基原料、焦磷酸钠、重铬酸钾、离心管(Corning)、Sun Shine Bio 琼脂糖(西班牙)购自武汉科昊佳生物科技有限公司;Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR(TaKaRa)、Premix Taq (Ex Taq Version 2.0, Takara)、RNase-free Water (TaKaRa)、DNA marker、DNA loading buffer(6X)购于武汉友名生物技术有限公司;放线菌特异性引物^[40]由武汉擎科生物技术有限公司合成;其余试剂为国产分析纯试剂。

恒温摇床(TS-2102C)购自上海百典仪器设备有限公司;超净工作台(SW-CJ-2FD)购自苏州安泰空气技术有限公司;光照培养箱(HP300G-C)购自上海精胜科学仪器有限公司;超声波清洗器(SB-3200DTN)购自宁波新芝生物科技股份有限公司;微量核酸蛋白检测仪(Nano Drop 2000)购自美国 Thermo Scientific 公司;梯度 PCR 仪(T3)购自德国 Biometra 公司;凝胶成像系统(G-BOX)购自基因有限公司。

2 方法

2.1 样品预处理

将每个样点 3 个风化岩壁样品(无菌研磨并过筛)各取 10 g 于无菌自封袋中混匀,称取混匀后的样品 10 g 置于无菌锡箔纸上,于 55 °C 加热 1 h,以完全去除样品中的水分及大部分细菌与真菌的污染^[36]。

将热处理后的风化岩壁样品置无菌 250 mL 三角瓶中,加入 90 mL 2 % 无菌焦磷酸钠($Na_4P_2O_7$)溶液(121 °C 灭菌 20 min),置摇床于 120 r/min,振荡 30 min,使样品中微生物充分分散。将分散后的样品置槽式超声波清洗机处理 1 min(50 W),使微生物与风化岩壁更好的分离。

2.2 菌种分离与纯化

采用稀释涂布法分离放线菌。将预处理的样品置摇床 120 r/min,振荡 20 min,取 1 mL 混匀样品于 9 mL 0.9 % 无菌生理盐水中,连续梯度稀释至 10^{-5} ,取 200 μ L 浓度 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 的稀释液,均匀涂于 6 种培养基,三次实验重复,18 °C 恒温无光培养 15 d。观察分离培养基菌落生长情况,根据菌落颜色、形态、色素与否则等特征,挑取肉眼判断为放线菌的菌落,在高氏一号琼脂培养基划线纯化,并在 18 °C 恒温无光培养培养 7 d,取生长良好的纯化菌株平板置于 4 °C 冰箱中保存。

2.3 DNA 提取,PCR 扩增及 16S rRNA 鉴定

在 1.5 mL 无菌 PCR 管中加入 50 μ L 裂解液(Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR, TaKaRa),用无菌枪头挑取少量单菌落边缘菌丝与裂解液混合,吹打混匀,置 70 °C 水浴 10 min 后于 5 000 r/min 离心 5 min,用微量核酸蛋白检测仪测定上清液中双链 DNA 浓度和 OD260/OD280 吸收值比值。将符合标准的菌株 DNA 稀释至 10 ng/ μ L,作为 PCR 扩增模板。PCR 扩增采用 50 μ L 体系:模板 DNA 3 μ L、Premix Taq(Ex Taq Version 2.0, Takara) 25 μ L、放线菌特异性引物 S-C-Act-235-a-S-20(5'-CGCGGCCTATCAGCTTGTTG-3')(正向)和 S-C-Act-878-a-A-19(5'-CCGTACTCCCCAGGCGGGG-3')(反向)^[40]各 1 μ L(20 pmol/ μ L),RNase-free Water(TaKaRa) 20 μ L。扩增条件为:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,25 次循环,72 °C 后延伸 10 min。扩增完毕后,取 5 μ L PCR 扩增产物与 2 μ L 上样缓冲液混匀后于 1 % 琼脂糖凝胶进行检测(120 V 80 mA,电泳 30 min),在凝胶成像系统观察电泳结果。将扩增成功且目标条带较亮的样品送武汉天一辉远生物科技有限公司,于 ABI-3730 测序仪测定菌株 16S rRNA 基因序列。

2.4 基因序列分析及系统进化树的构建

将测序成功的放线菌菌株 16S rRNA 基因序列

在 EzBioCloud 数据库 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) 及 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中登录并进行序列相似性比对搜索, 获得并下载相似性较高且是有效描述的典型菌株 16S rRNA 序列。用 Mothur 软件将测序菌株的 16S rRNA 基因序列在 99% 相似性水平进行 OTU (Operational Taxonomic Units, OTU) 聚类^[41], 提取代表性 OTU 的 16S rRNA 基因序列, 与其下载的相似性较高的有效发表菌株 16S rRNA 基因序列在 MEGA 5 软件中用 Clustal W 程序进行多重序列比对, 采用 MEGA 5 软件以最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 构建系统发育树^[42]。依据模型选择中运算得到最小的 BIC (Bayesian information criterion) 值确定最佳核苷酸替换模型 (GTR+G), 启发式搜索 (heuristic search) 选取 NNI (Nearest neighbor interchange), 自展值设置为 1 000 以校验系统发育树拓扑结构的稳定性。选择一株酸杆菌 *Acidobacteria bacterium* KBS83 作为系统发育树外类群。

3 结果与分析

3.1 不同培养基分离效果

对和尚洞三个样点的 9 份风化岩壁样品, 使用 6 种不同的培养基进行分离, 共获得放线菌 72 株 (无光区: 19 株, 弱光区: 53 株)。其中, GW1 培养基 (获 29 株) 和改良高氏二号培养基 (获 23 株) 分离效果最好; 其次是风化岩壁浸汁琼脂培养基 (获 11 株) 和高氏一号琼脂培养基 (获 8 株); 海藻糖-脯氨酸培养基 (获 1 株) 及 Pridham 琼脂培养基 (获 0 株) 分离效果最差。GW1 培养基、改良高氏二号培养基和笔者自主设计的风化岩壁浸汁琼脂培养基均分离获得 2 个属的放线菌。三个样点的菌落形成单位 (Colony Forming Units; CFU) 分别为 W1 (2.1×10^7 CFU · g⁻¹)、W2 (2.9×10^7 CFU · g⁻¹) 和 W3 (4.5×10^7 CFU · g⁻¹), 但无光区 W1、W2 样点分离获得的放线菌菌株较少, 分别为 9 株和 10 株; 而弱光区 W3 样点分离获得的放线菌株数最多, 为 53 株。在不同培养基分离获得的放线菌菌株, 在高氏一号琼脂培养基上纯化并在 18 °C 恒温无光培养培养 7 d, 代表性菌株培养特征见图 2。

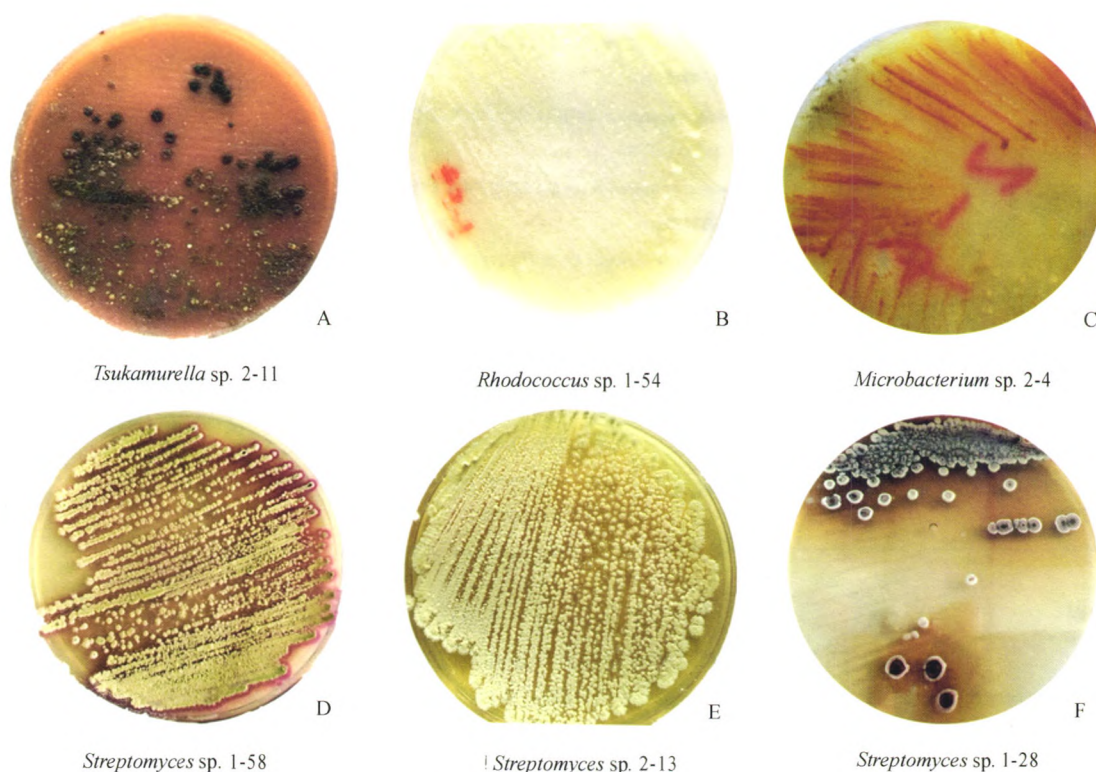


图 2 和尚洞风化岩壁四个放线菌属代表菌株培养特征

(A—冢村氏菌属 B—红球菌属 C—微杆菌属 D—F—链霉菌属)

Fig. 2 Colony characteristics of representative strains in four genera of Actinomycetes isolated from weathered rocks in Heshang Cave

(A—*Tsukamurella* B—*Rhodococcus* C—*Microbacterium* D—F—*Streptomyces*)

3.2 16S rRNA 系统发育分析

72 株放线菌序列在 99% 相似性水平上分为 7 个 OTU, 将提取的代表性序列与参考序列在 MEGA 5 软件中用最大似然法进行聚类分析并构建系统发育树(图 3)。依据 2012 年最新的放线菌分类系统^[43] 72 株放线菌均属于放线菌纲(Actinobacteria); 下属三个目: 链霉菌目(Streptomycetales)、棒杆菌目(Corynebacteriales)和微球菌目(Micrococcales); 四个属: 链霉菌属(*Streptomyces*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、冢村氏菌属(*Tsukamurella*)和微杆菌属(*Microbacterium*)。其中, 以链霉菌属分离株数最多, 其它三属均各有 1 株。69 株属于链霉菌目(Streptomycetales)、链霉菌科(Streptomycetaceae)、链霉菌属(*Streptomyces*); 该属 69 株放线菌在 99% 相似性水平上与 EzBioCloud 及 NCBI 数据库中高相似性菌株聚为四个分支, 菌株 1—45(OTU 05, 图 3)与 NCBI 数据库中分离于马铃薯块茎的纯培养菌株 *S. sp.* STR77 (KT717916) 相似性为 99.18%; 另外三个分支与 EzBioCloud 数据库典型菌株相似性均高于 99%, 其中, 菌株 2—1(OTU 03, 图 3)与菌株 *S.*

laurentii LMG19959(AJ781342)相似性为 99.02%；另 3 株菌(OTU 02, 图 3)与菌株 *S. coelescens* DSM 40421 (AF503496)相似性为 99.34%；该属其它菌株均聚类在 OTU 01(图 3)，与菌株 *S. anulatus* NRRL B-2000 (DQ026637)相似性均高于 99%。

3 个 OTU (OTU 06, OTU 07, OTU 04) 在 99% 相似性水平上与 EzBioCloud 数据库中高相似性菌株聚为三个独立分支, 分属于红球菌属 (*Rhodococcus*)、冢村氏菌属 (*Tsukamurella*) 和微杆菌属 (*Microbacterium*)。其中, 菌株 1—54 (OTU 06, 图 3) 与菌株 *R. erythropolis* DSM 43066 相似性为 99.02%, 归属于棒杆菌目 (*Corynebacteriales*)、诺卡氏菌科 (*Nocardiaceae*)、红球菌属 (*Rhodococcus*); 菌株 2—11 (OTU 07, 图 3) 与菌株 *T. carboxydivorans* Y2 相似性为 99.03%, 归属于棒杆菌目 (*Corynebacteriales*)、冢村氏菌科 (*Tsukamurellaceae*)、冢村氏菌属 (*Tsukamurella*); 菌株 2—4 (OTU 04, 图 3) 与菌株 *M. resistens* DMMZ 1710 相似性 98.70%, 归属于微球菌目 (*Micrococcales*)、微杆菌科 (*Microbacteriaceae*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)。

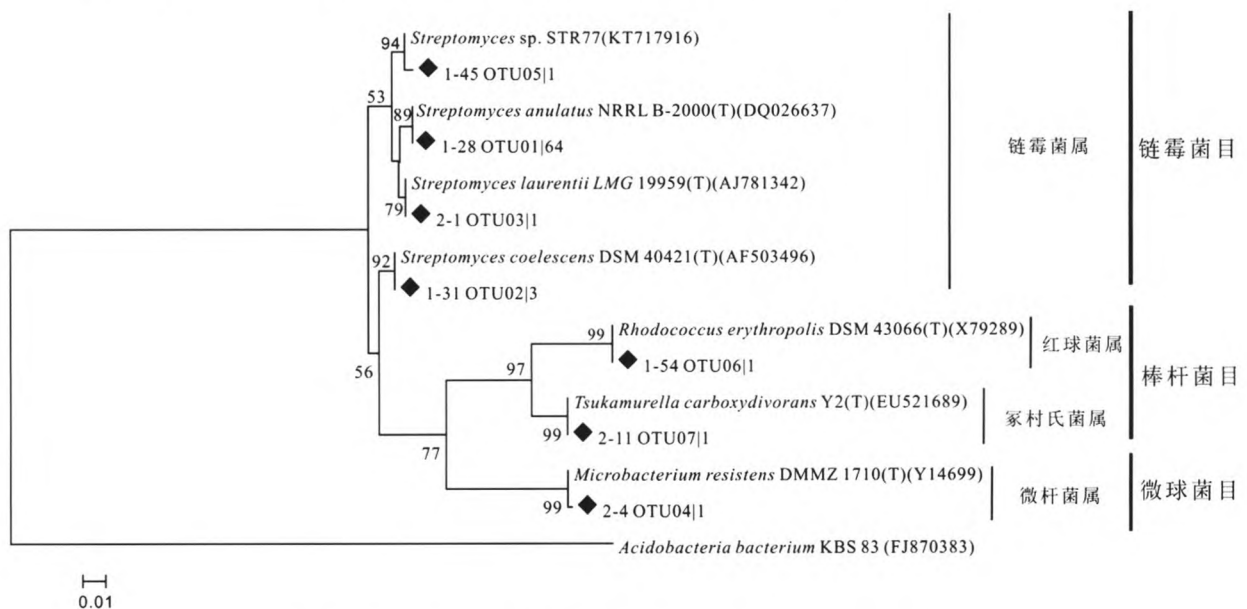


图3 和尚洞风化岩壁可培养放线菌系统发育树(最大似然法)

菱形表示 72 株放线菌序列经 Mothur 软件聚类 (99 % 相似性水平) 后代表菌株的编号, OTU 后数字表示该菌株所属 OTU 的编号, 竖线后数字表示该 OTU 包含的总菌株数; 括号中所示为菌株在 EzBioCloud 及 NCBI 中登录号。

Fig. 3 Phylogenetic tree of culturable actinobacteria isolated from weathered rocks in Heshang Cave (Maximum Likelihood, M L). The highlighted diamonds stands for the representative strains of 72 isolates after clustered by Mothur in 99% threshold. Which OTU the strain belongs to were numbered after OTU. Total strains of each OTU were listed after vertical bar. The accession numbers of top hit strains in EzBioCloud or NCBI database were shown in brackets.

4 讨论

放线菌在自然界分布广泛,在呈中性或微碱性的土壤中数量最多。岩溶洞穴环境偏碱性,截止2016年已从国内外洞穴样品中分离到至少10个目、23个科及55个属的放线菌^[15],鲜见的冢村氏菌属(*Tsukamurella*)在洞穴环境中尚未见报道。本研究在和尚洞风化岩壁分离获得的链霉菌属、红球菌属和微杆菌属,在双河洞^[13]、神仙洞^[14]、腾龙洞及龙骨洞^[15]的土壤中已分离到,冢村氏菌属是在和尚洞风化岩壁分离到的一个稀有放线菌属。和尚洞处长江中游的清江流域,该地区岩溶地貌广泛发育,春夏多雨、秋冬干燥,位于该区的和尚洞自然环境相对封闭、湿润,为洞穴微生物的繁殖、保存提供了有利的条件。通过对和尚洞岩壁放线菌的初步研究,除分离获得洞穴常见放线菌属外,还分离到在该生境未见报道的1个放线菌属,说明该洞穴蕴含较丰富的放线菌资源,值得进一步研究。

岩溶地区微生物的代谢活动深刻影响着其栖息表层环境的矿物特征,其岩溶作用对地表生态系统的影响也日益受到学者的重视。和尚洞风化岩壁可培养放线菌以链霉菌属为主,这与国内学者在其它洞穴土壤中的研究结果一致^[13-15]。链霉菌属放线菌已进化0.45亿年^[44],对难降解有机复合物具有较强的降解能力。目前,有关链霉菌属放线菌岩溶作用研究主要集中在矿物岩石的溶蚀和诱导形成次生矿物两个方面,对于其在碳酸盐岩的溶蚀作用及沉积作用的研究仍比较欠缺。已有研究发现,来源于岩溶环境中的链霉菌属放线菌活动不仅可以提高石灰岩中 Ca^{2+} 的释放量^[26],而且其胞内催化微生物风化碳酸盐岩的关键酶——碳酸酐酶,活性较高^[45],显著促进了矿物岩石的溶蚀。另外,岩溶环境中的链霉菌属放线菌可诱导沉淀碳酸盐矿物,如源自石灰岩表面微生物席的*Streptomyces luteogriseus* DHS C014可诱导沉淀方解石^[18]、源自Altamira洞穴微生物席中的链霉菌可诱导沉淀水菱镁矿、针状方解石^[46]等。由此可见,作为放线菌的主要类群,链霉菌属放线菌参与了岩溶环境中碳酸盐岩溶蚀及沉淀过程,潜在影响着喀斯特地区的岩溶生态过程。本研究初步报道了和尚洞风化岩壁中可培养放线菌的主要种属信息,发现链霉菌仍是可培养放线菌的优势类群,为进一步研究链霉菌属在洞穴岩壁风化、溶蚀过程及碳酸盐矿物沉积过程中

潜在的生态作用提供了实验基础。

参考文献

- [1] 王世杰,季宏军,欧阳自远,等.碳酸盐岩风化成土的初步研究[J].中国科学:D辑,1999,29(5):441-449.
- [2] 张远海,朱德浩.中国大型岩溶洞穴空间分布及演变规律[J].桂林理工大学报,2012,32(1):20-28.
- [3] Pedersen K. Exploration of deep intraterrestrial microbial life: current perspective [J]. FEMS Microbiology Letters, 2000,185(1):9-16.
- [4] 张万芹,张永光,房保柱,等.贵州兴义喀斯特洞穴土可培养细菌多样性及其产蛋白酶、淀粉酶活性筛选[J].微生物学通报,2016,43(5):955-964.
- [5] Barton H A, Northup D E. Geomicrobiology in cave environments: past, current and future perspectives [J]. Journal of Cave and Karst Studies, 2007,69(1):163-178.
- [6] Baskar S, Baskar R, Thorseth I H, et al. Microbially induced iron precipitation associated with a Neutrophilic Spring at Borra caves, Vishakhapatnam, India [J]. Astrobiology, 2012, 12(4): 327-346.
- [7] 连宾,袁道先,刘再华.岩溶生态系统中微生物对岩溶作用影响的认识[J].科学通报,2011,56(26):2158-2161.
- [8] 何寻阳,王克林,于一尊,等.岩溶区植被和季节对土壤微生物遗传多样性的影响[J].生态学报,2009,29(4):1763-1769.
- [9] 何寻阳,苏以荣,梁月明,等.喀斯特峰丛洼地不同退耕模式土壤微生物多样性[J].应用生态学报,2010,21(2):317-324.
- [10] 贺秋芳,杨平恒,袁文昊,等.微生物与化学示踪岩溶地下水补给源和途径[J].水文地质工程地质,2009,36(3):33-38.
- [11] 邹胜章,邓振平,梁彬,等.岩溶水系统中微生物迁移机制[J].环境污染与防治,2010,32(10):1-4.
- [12] 冯慧芳,贺秋芳,谢世友,等.重庆岩溶山区农村饮用水水质评价及分析[J].地球与环境,2010,38(1):54-58.
- [13] 戴素娟,郭琳,刘少伟,等.双河洞放线菌多样性和抗菌活性的初步研究:以阴河洞和杉林洞为例[J].中国岩溶,2015,34(6):624-630.
- [14] 戴素娟,李静,孙承航,等.河南神仙洞放线菌资源勘探及抗菌活性筛选[J].中国抗生素杂志,2015,40(9):641-648.
- [15] 祖健,刘少伟,庾利,等.湖北利川喀斯特洞穴放线菌多样性及抗菌活性研究[J].中国抗生素杂志,2016,41(3):186-195.
- [16] Barton H A. Introduction to cave microbiology: a review for the non-specialist [J]. Journal of Cave and Karst Studies, 2006, 68(2):43-54.
- [17] Riquelme C, Marshall Hathaway J J, Enes Dapkevicius M L N, et al. Actinobacterial diversity in volcanic caves and associated geomicrobiological interactions [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6:1-16.
- [18] Cao C L, Jiang J H, Sun H, et al. Carbonate mineral formation under the influence of limestone-colonizing actinobacteria:

- morphology and polymorphism [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, (7):1-11.
- [19] Tomczyk-Zak K, Zielenkiewicz U. Microbial Diversity in Caves [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2016, 33, 20-38
- [20] Barton H A, Taylor N M, Kreate M P, et al. The impact of host rock geochemistry on bacterial community structure in oligotrophic cave environments [J]. *International Journal of Speleology*, 2007, 36:93-104.
- [21] Pasic L, Kovce B, Sket B, et al. Diversity of microbial communities colonizing the walls of a karstic cave in Slovenia [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2010, 71:50-60.
- [22] Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Pinar G, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Llonin and La Garma) [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47: 235-247.
- [23] Battistuzzi F U, Hedges S B. A major clade of prokaryotes with ancient adaptation to life on land [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2009, 26 (2):335-343.
- [24] Abdulla H. Bioweathering and biotransformation of granitic rock minerals by Actinomycetes [J]. *Microbiology Ecology*, 2009, 58:753-761.
- [25] Chizhikova N P, Omarova E O, Lobakova E S, et al. Crystallochemical transformation of phyllosilicates under the impact of cyanobacteria and actinomycetes [J]. *Eurasian Soil Science*, 2009, 42:69-74.
- [26] 贾丽萍, 李为, 朱敏, 等. 典型细菌、真菌、放线菌对石灰岩动态溶蚀效果比较[J]. *应用与环境生物学报*, 2007, 13 (1): 126-130.
- [27] Liu Q Y, Wang H M, Zhao R, et al. Bacteria isolated from dripping water in the oligotrophic Heshang Cave in central China [J]. *Journal of Earth Science*, 2010, 21:325-328.
- [28] Yun Y, Xiang X, Wang H M, et al. Five-year monitoring of bacterial communities in dripping water from the Heshang Cave in central China; implication for paleoclimate reconstruction and ecological functions [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2016, 1-11.
- [29] Gong L F, Wang H M, Xiang X, et al. pH shaping the composition of *sqhC*-containing bacterial communities [J]. *Geomicrobiology Journal*, 2015, 32 (5):433-444.
- [30] Wang H M, Zeng C P, Liu Q Y, et al. Calcium carbonate precipitation induced by a bacterium strain isolated from a n oligotrophic cave in Central China [J]. *Frontiers of Earth Science in China*, 2010, 4 (2):148-152.
- [31] Wang H M, Dong Q, Zhou J P, et al. Zinc phosphate dissolution by bacteria isolated from an oligotrophic karst cave in central China [J]. *Frontiers of Earth Science*, 2013, 7 (3):375-383.
- [32] Man B Y, Wang H M, Xiang X, et al. Phylogenetic diversity of culturable fungi in the Heshang Cave, central China [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6:1-11.
- [33] 赵锐, 王红梅, 刘倩瑛, 等. 湖北清江和尚洞滴水微生物群落随空间和季节的变化[J]. *地球科学—中国地质大学学报*, 2010, 35 (6):899-907.
- [34] 万军伟, 沈继方, 晁念英. 清江半峡地区岩溶洞穴发育特征及其旅游资源[J]. *中国岩溶*, 1997, 16 (3):268-274.
- [35] Hu C Y, Henderson G M, Huang J H, et al. Report of a three-year monitoring programme at Heshang Cave, central China [J]. *International Journal of Speleology*. 2008, 37(3), 143-151.
- [36] 姜怡, 李文均, 段淑蓉, 等. 稀有放线菌分离方法[J]. *微生物学通报*, 2006, 33 (1):181-183.
- [37] Xu L H, Li W J, Cui X L, et al. Discovery of a vast amount of unknown actinomycetes from extreme environments in Xinjiang and Qinghai Province, China [J]. *Journal of Yunnan University*, 2003, 25 (3):283-292.
- [38] 熊鹰, 余金辉, 阿不都克里木·热依木, 等. 2 株嗜碱性放线菌的分离鉴定及特性研究[J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2012, 46 (5):596-605.
- [39] 关统伟, 吴晋元, 唐蜀昆, 等. 新疆塔里木盆地可培养嗜盐放线菌系统发育多样性[J]. *微生物学通报*, 2008, 35 (11): 1698-1702.
- [40] Stach J E M, Maldonado L A, Ward A C, et al. New primers for the class actinobacteria; application to marine and terrestrial environments [J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5 (10):828-841.
- [41] Stach J E M, Maldonado L A, Masson D G, et al. Statistical approaches for estimating actinobacterial diversity in marine sediments [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69 (10):6189-6200.
- [42] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular biology and evolution*, 2011, 28 (10):2731-2739.
- [43] 阮继生. “伯杰氏系统细菌学手册(第二版)”第 5 卷与我国的放线菌系统学研究[J]. *微生物学报*, 2013, 53 (6):521-530.
- [44] Embley T M, Stackebrandt E. The molecular phylogeny and systematics of the Actinomycetes [J]. *Annual Review of Microbiology*, 1994, 48:257-289.
- [45] 李为, 贾丽萍, 余龙江, 等. 不同种类微生物及其碳酸酐酶对土壤—灰岩系统钙镁锌元素迁移作用的土柱模拟实验研究[J]. *土壤*, 2007, 39 (3):453-459.
- [46] Canaveras J C, Hoyos M, Sanchez-Moral S, et al. Microbial communities associated with hydromagnesite and needle-fiber aragonite deposits in a karstic cave (Altamira, Northern Spain) [J]. *Geomicrobiology Journal*, 1999, 16:9-25.

Isolation and 16S rRNA gene sequence analysis of Actinomycetes from weathered rocks in Heshang Cave, central China

MAN Baiying^{1,2}, CHENG Xiaoyu¹, WANG Hongmei^{1,2}, YUN Yuan^{1,2}, ZHONG Yuhong¹

(1. School of Environmental Studies, China University of Geosciences, Wuhan, Hubei 430074, China;

2. State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan, Hubei 430074, China)

Abstract The specific goal of this work was to investigate the actinobacterial diversity in the weathered rocks by culture-dependent approach in Heshang Cave, Hubei, China. Three weathered rocks samples (W1, W2 and W3) were collected from aphotic zone and twilight zone in Heshang Cave with sterile centrifuge tubes in August, 2015. Five modified media and one self-designed medium of extracting of weathered rocks agar medium were used for isolation of actinomycetes in the weathered rocks of Heshang Cave. The isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing using special primer for actinomycetes. Result shows that in total of 72 strains obtained by pure culture from 6 different media. The phylogenetic analysis showed that 72 actinomycetes sequences were classified into four genera in three orders of Actinobacteria with *Streptomyces* being dominative. The number of isolated strains in genera *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* and *Microbacterium* was 69, 1, 1 and 1, respectively. Samples of W1 and W2 in aphotic zone were only isolated 9 and 10 strains respectively, while sample of W3 in twilight zone were obtained 53 strains. The results offer valuable information and isolates for the subsequent study on the interaction between carbonate and microbes.

Key words Heshang Cave, weathered rocks, actinomycetes, pure culture, 16S rRNA

(编辑 张玲)