

# 鸡冠洞洞穴环境微生物资源调查及多样性研究



报 告 人：张玲玉  
指导老师：李文均 教授  
                  聂国兴 教授  
专    业：水产养殖  
时    间：2018-11-11

# 目 录



1

立题依据



2

实验内容



3

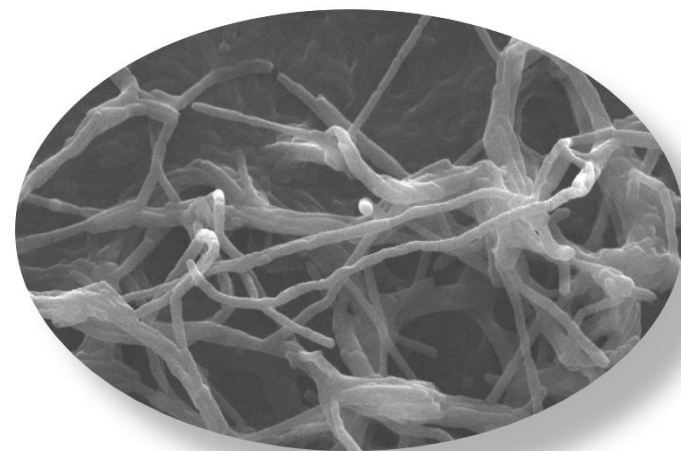
已开展的主要研究工作



4

下步工作计划

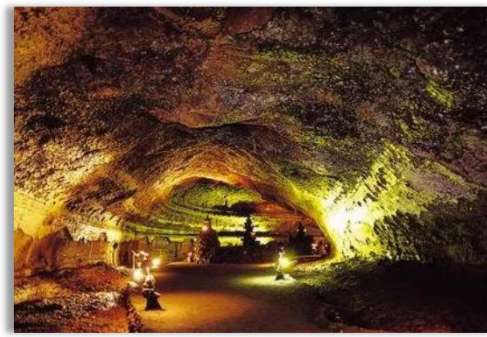
# 第一 立题依据



# 立题依据

## ◆ 洞穴介绍

洞穴是一种地下喀斯特地貌。根据国际洞穴联合会（International Union of Speleology）定义，洞穴是指人可进出的天然地下空间，可以部分或全部被沉积物、水或冰所填充。由于其内部缺少阳光、生物可用的有机碳和营养物质含量低而被认为是陆地黑暗生态系统的一种极端环境。



# 立题依据

## ◆ 我国岩溶环境分布

地表：9.

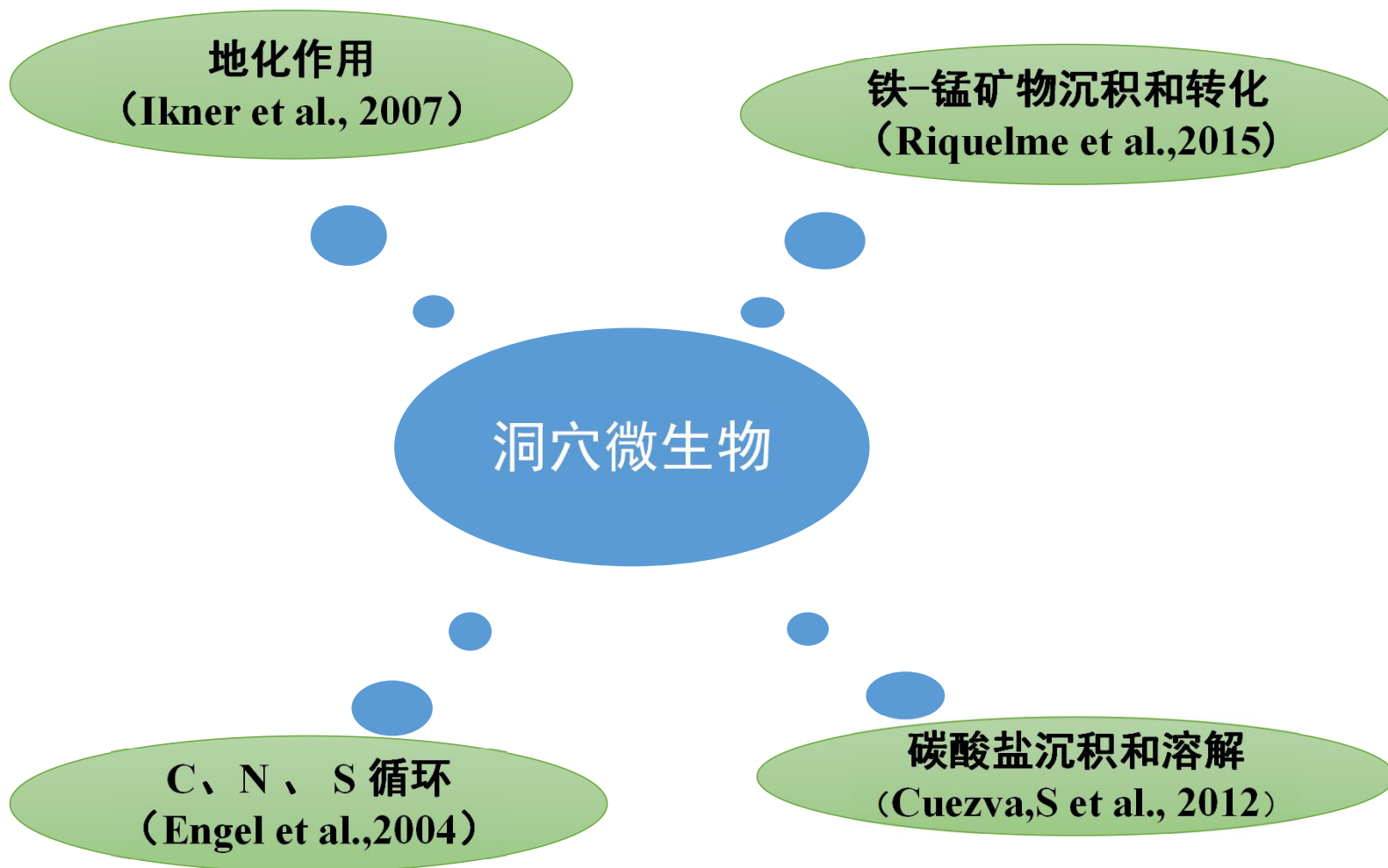
### 中国喀斯特分



- ★ 首都
- 世界自然遗产提名
- 碳酸盐岩石地层
- 碳酸盐岩石地层
- 非碳酸盐岩石地层
- 非碳酸盐岩石地层

# 立题依据

## ◆ 洞穴微生物研究现状



# 立题依据

## ◆ 洞穴微生物的应用

目前，洞穴微生物的应用主要集中在代谢产物制剂，如抗菌素，表面活性剂、酶制剂等方面。

①20世纪90年代，Larry Mallory等（在Lechuguilla Cave和Mammoth Cave中分离培养所得的微生物，其产生的次生代谢产物能有效杀死癌细胞。

②Gálvez 等在对Cueva de los Murciéagos的研究中，分离得到一株地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*) A12，能分泌一种抗真菌物质。

③有研究表明喀斯特洞穴分离的放线菌资源部分具有良好的蛋白酶和淀粉酶活性，这种现象可能与微生物之间竞争有限营养资源有关（张万芹等，2016）



# 立题依据

## ◆ 研究目的

本文基于纯培养和免培养的方法对鸡冠洞、无名洞洞穴环境中的微生物进行研究，

- ◆ 期望得到更多的洞穴微生物资源，挖掘新分类单元。
- ◆ 了解两个洞穴环境微生物的多样性及分布特征。
- ◆ 筛选出一些能够抑制水产动物致病菌的活性菌株，应用于水产养殖。



# 立题依据

## ◆ 研究内容

- 洞穴微生物免培养分析
- 洞穴可培养微生物初探：对洛阳鸡冠洞和无名洞14个样品进行纯培养和免培养分析，探索2个洞穴的微生物多样性，挖掘更多的微生物种质资源，另外比较开发洞穴和野生洞穴微生物类群的差异性。
- 潜在新分类单元的多相分类鉴定
- 洞穴微生物抗菌活性实验

## 第二 实验内容

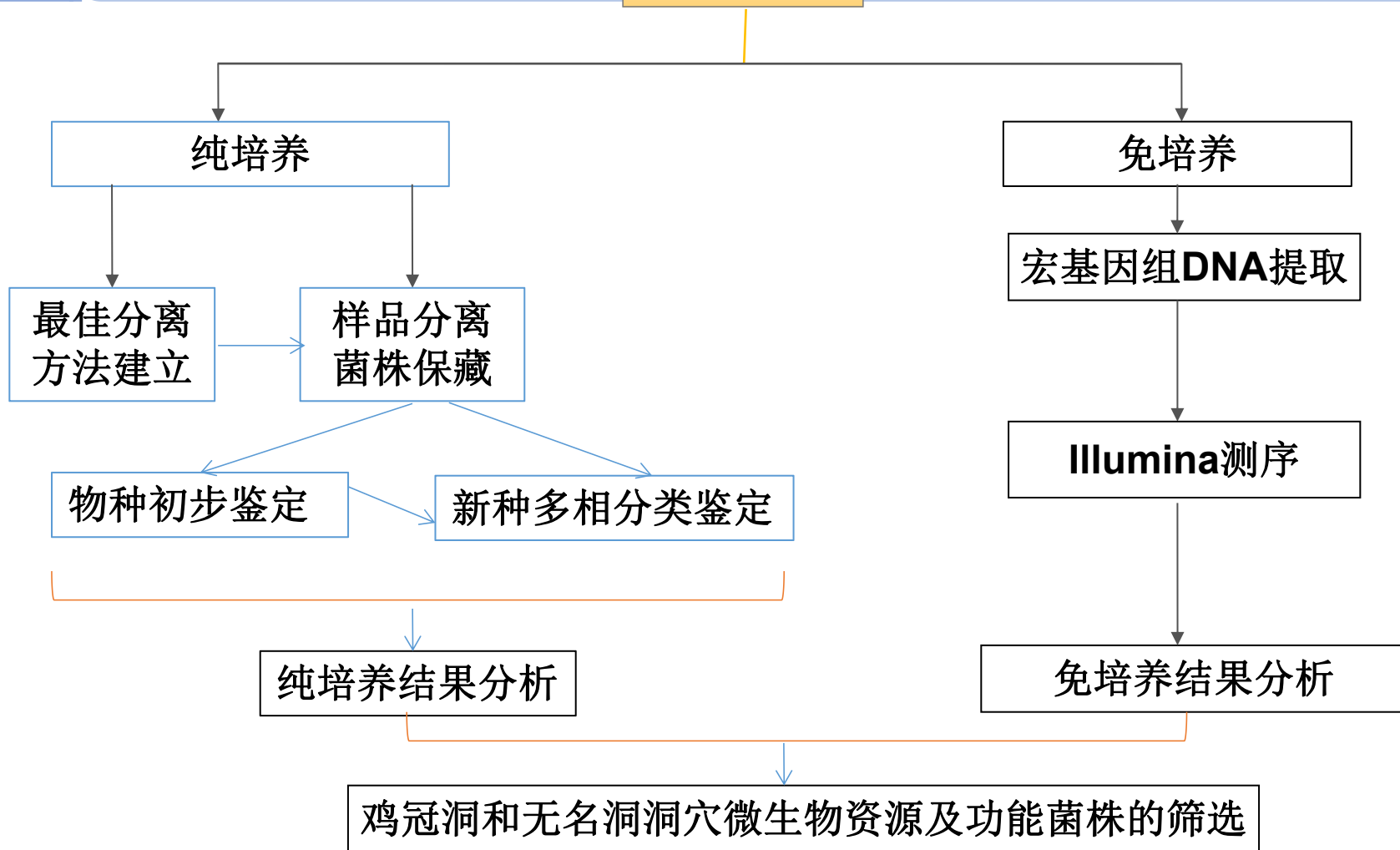
技术路线



实验方案



## 样品采集



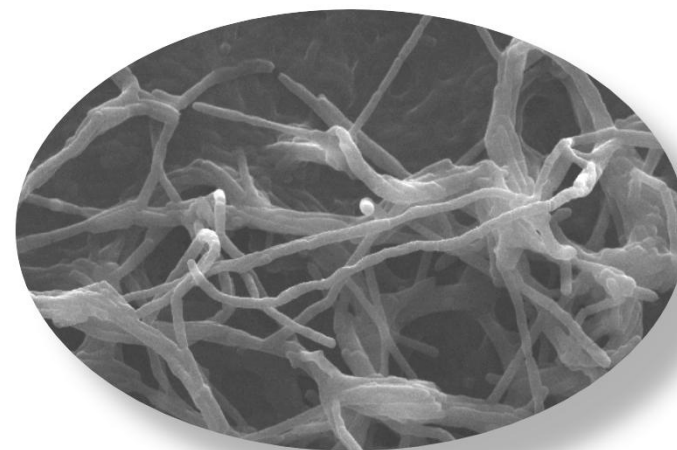
免培养：提取环境样品总DNA，借助高通量测序技术来检测洞穴环境样品中微生物多样性。

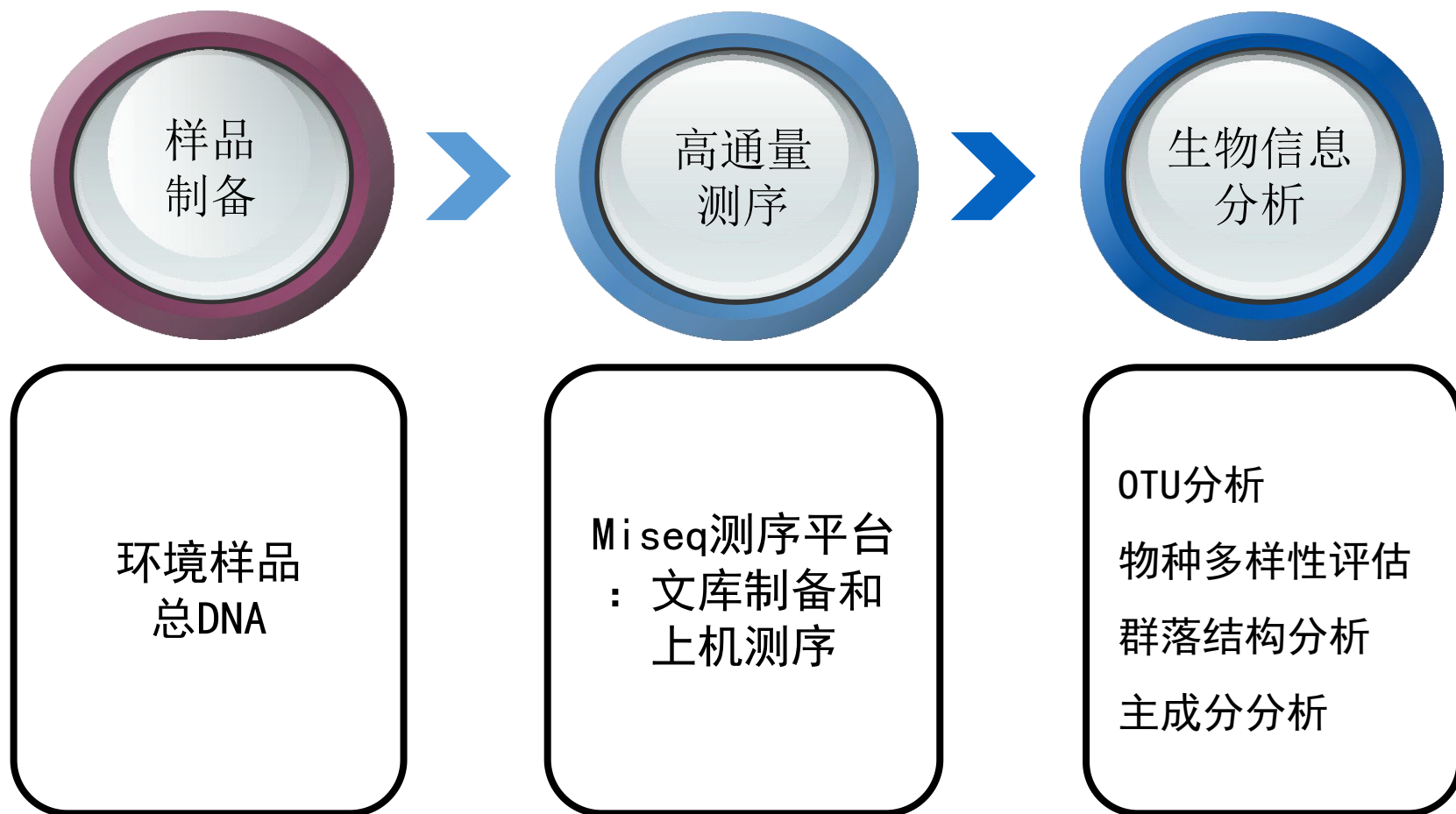
纯培养：通过预实验设计合适的分离方法，获得大量的微生物资源

新物种鉴定：应用多相分类技术，对候选新物种进行系统分类学研究，明确其分类学地位并进行科学命名。

洞穴微生物抗菌活性研究：对鸡冠洞、无名洞微生物抗菌活性进行研究，筛选出对水产动物致病菌有抑制作用的活性菌株

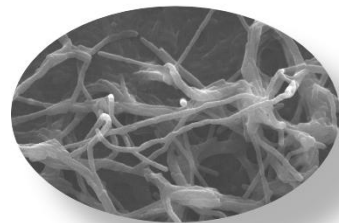
## 第三 已开展的主要研究工作



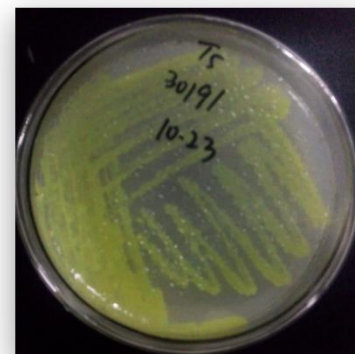
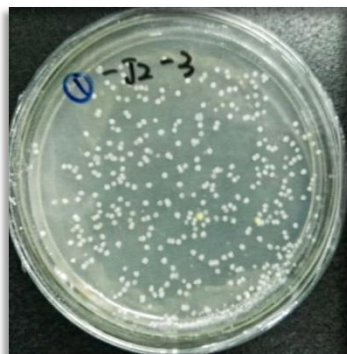
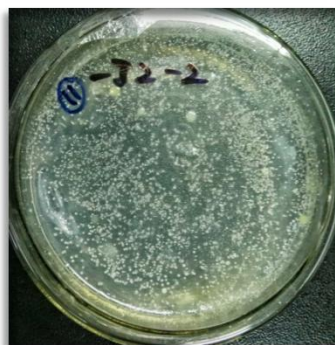


对洛阳鸡冠洞和无名洞洞穴14个环境样品进行总DNA提取。利用DNeasy PowerSoil Kit 试剂盒对洞穴样品进行宏基因组DNA的提取，提取之后对DNA进行Qubit浓度检测及电泳检测，看是否满足送样要求。

DNA样品已经送到测序公司，符合测序标准，目前高通量测序已经完成，测序公司已经给出数据，后续待进行多样性分析。



## ➤ 样品分离及菌株纯化（纯培养）



不同分离培养基，不同稀释度，不同温度



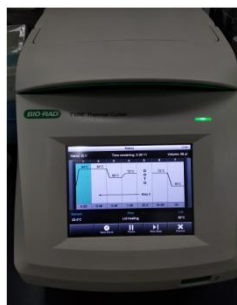
➤ 菌株鉴定及保藏



上清液为异丙醇（无色透明）

白色沉淀

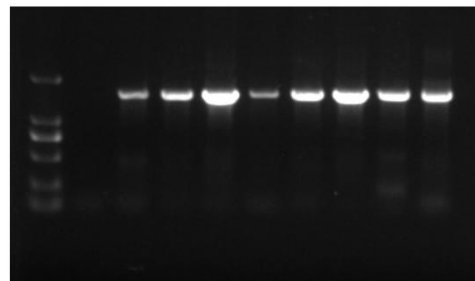
DNA提取



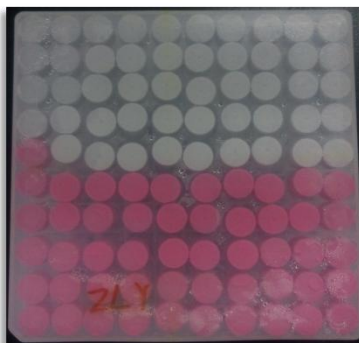
16S rRNA  
基因扩增

marker

2000bp—  
1500bp—

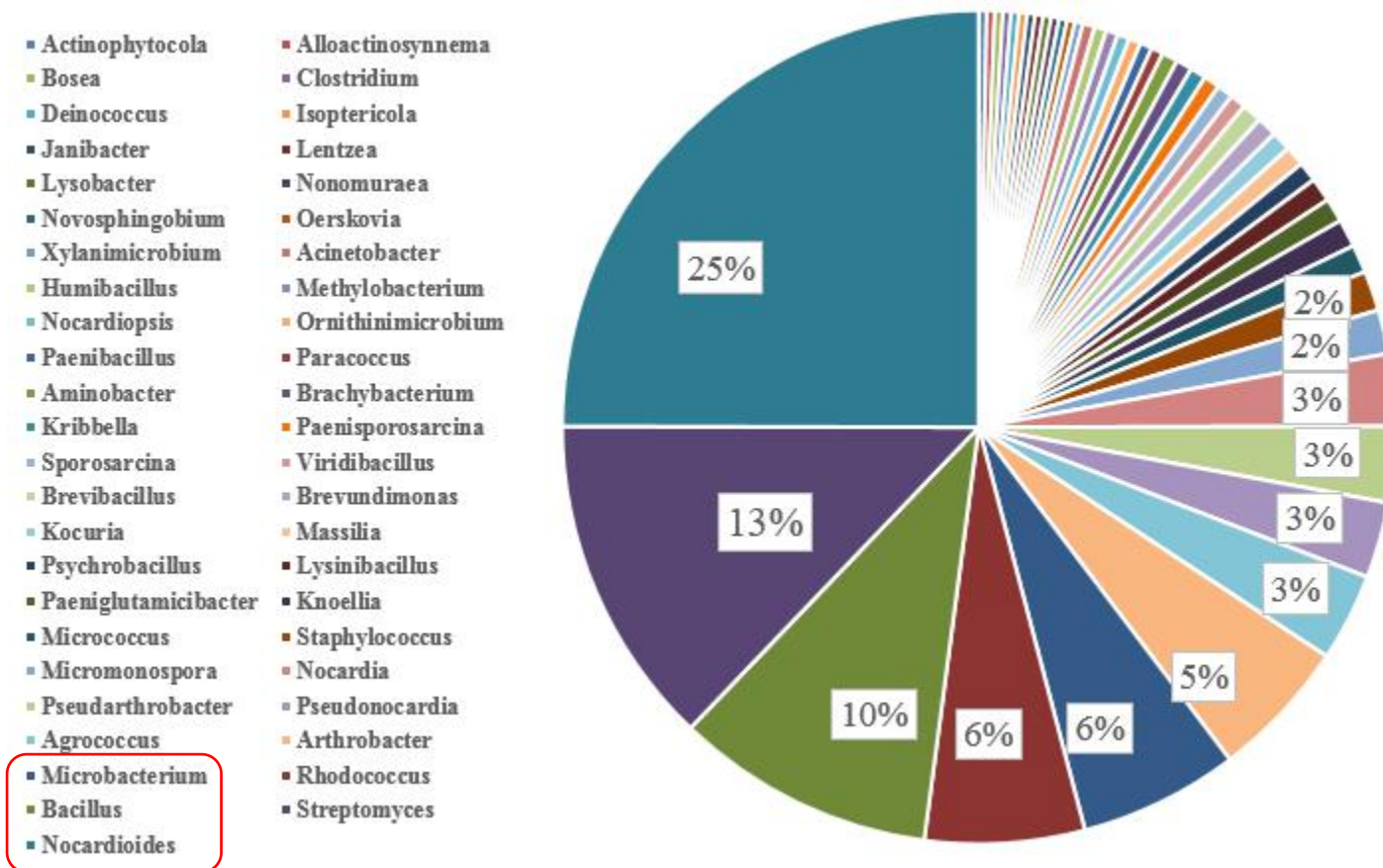


1%琼脂糖凝胶电泳检测



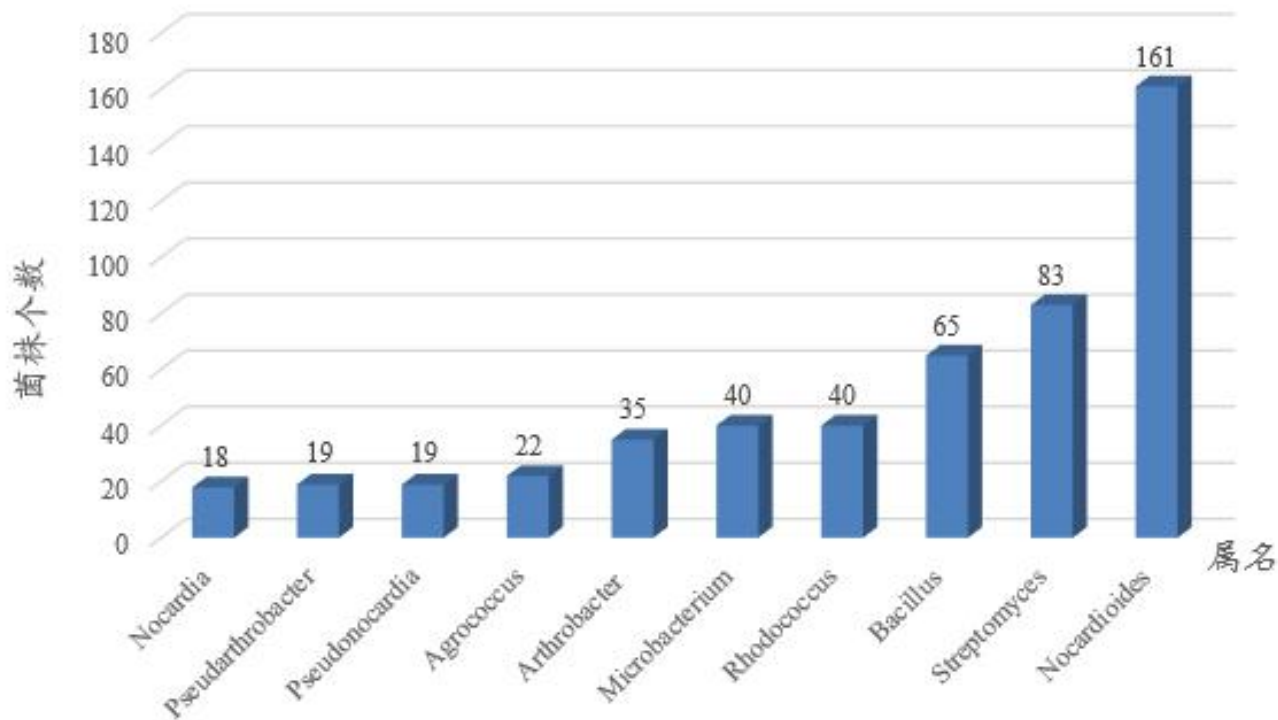
甘油管保藏和牛奶管保藏

### ➤ 纯培养结果



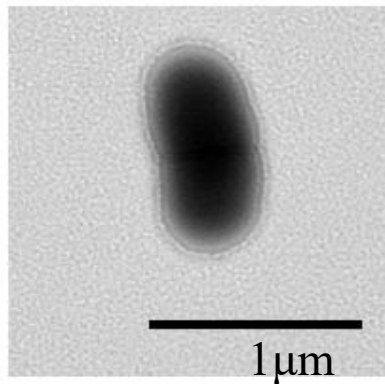
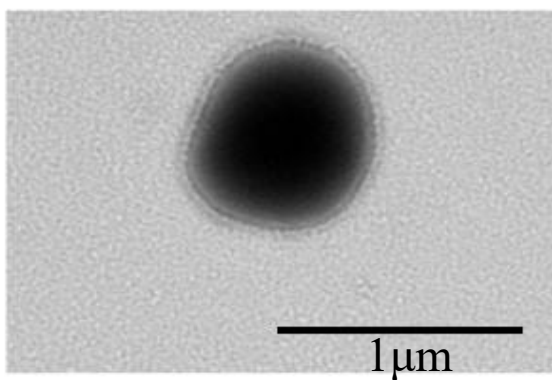
鸡冠洞及无名洞微生物多样性（属水平）

665株，67个属，202个种

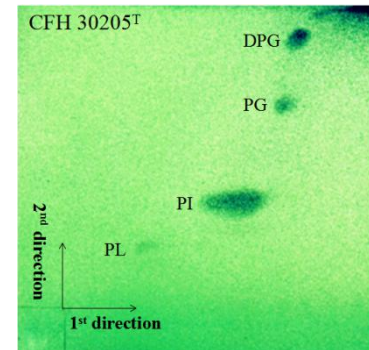


鸡冠洞及无名洞属水平上的优势类群 (top10)

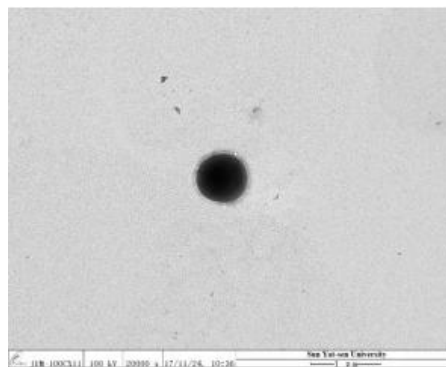
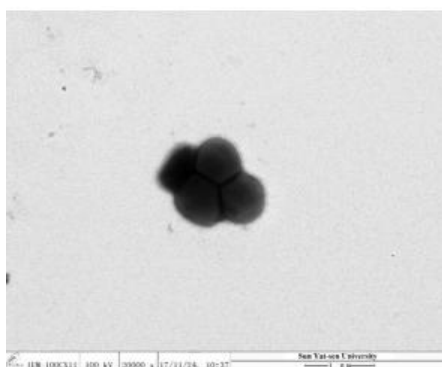
# 03 已开展的主要研究工作 (多相分类鉴定)



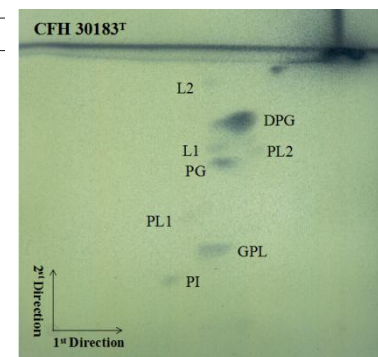
Fatty acids	1	2	3
<b>Saturated</b>			
C <sub>12:0</sub>	-	-	2.0
C <sub>16:0</sub>	1.6	1.3	1.6
C <sub>17:0</sub>	0.5	9.4	7.7
C <sub>18:0</sub>	-	1.9	2.1
C <sub>19:0</sub>	-	1.6	1.2
<b>Branched</b>			
iso-C <sub>14:0</sub>	0.7	-	-
iso-C <sub>15:0</sub>	-	0.9	1.1
iso-C <sub>16:0</sub>	25.4	24.0	25.8
iso-C <sub>17:0</sub>	0.5	2.3	1.9
iso-C <sub>18:0</sub>	2.2	2.2	2.3
iso-C <sub>19:0</sub>	1.0	-	-
iso-C <sub>14:1</sub> H	7.7	1.3	2.4
iso-C <sub>15:1</sub> H	1.7	0.7	1.0
anteiso-C <sub>14:0</sub>	22.2	5.1	-
anteiso-C <sub>15:0</sub>	-	-	0.5
anteiso-C <sub>16:0</sub>	0.5	-	0.6
anteiso-C <sub>17:0</sub>	1.1	1.1	1.5
C <sub>11:2OH</sub>	2.7	-	4.5



CFH 30205<sup>T</sup> *Nocardioides* sp.



Fatty acids	1	2
<b>Saturated</b>		
C <sub>12:0</sub>	2.1	2.3
C <sub>14:0</sub>	1.2	2.2
C <sub>17:0</sub>	-	-
<b>Branched</b>		
iso-C <sub>14:0</sub>	2.0	1.4
iso-C <sub>15:0</sub>	37.2	44.4
iso-C <sub>16:0</sub>	16.7	19.6
iso-C <sub>17:0</sub>	2.6	4.3
iso-C <sub>15:1</sub> F	2.9	2.4
iso-C <sub>16:1</sub> H	0.8	-
anteiso-C <sub>11:0</sub>	0.7	-
anteiso-C <sub>13:0</sub>	0.9	-
anteiso-C <sub>14:0</sub>	4.9	-
anteiso-C <sub>15:0</sub>	5.8	5.3
anteiso-C <sub>16:0</sub>	0.9	-

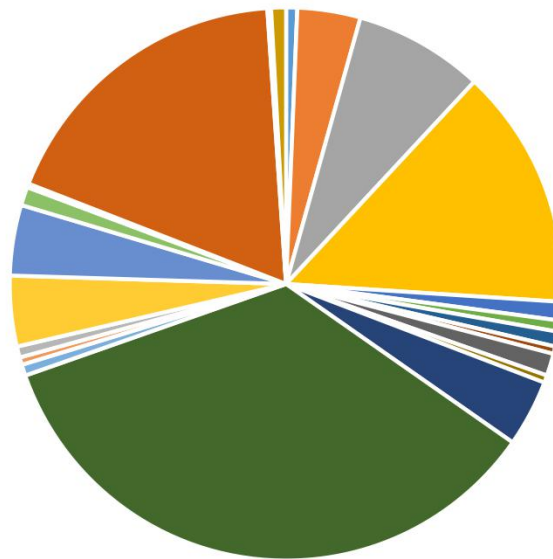


CFH 30183<sup>T</sup> *Ornithinimicrobium* sp.

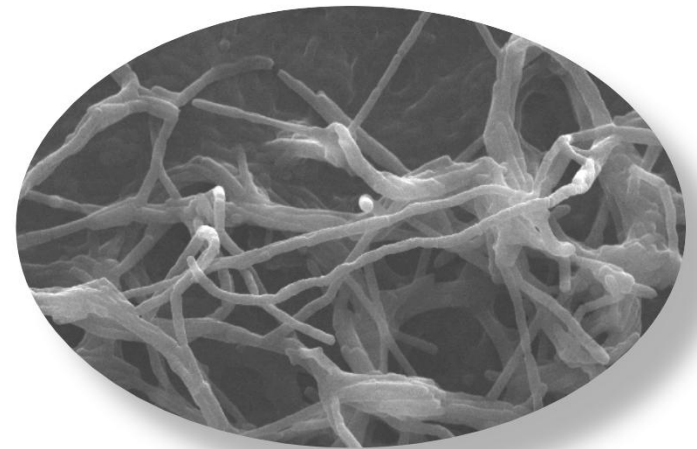
# 04 已开展的主要研究工作（抗菌活性实验）

测试菌株筛选—测试菌株活化—指示菌株活化—发酵实验—活性验证. 潜在活性菌株有112株，指示菌有4株。

- Acinetobacter
- Agromyces
- Arthrobacter
- Bacillus
- Brevundimonas
- Humibacillus
- Kribbella
- Lentzea
- Lysinibacillus
- Lysobacter
- Nocardia
- Nocardioides
- Nocardiosis
- Nonomuraea
- Paenibacillus
- Pseudarthrobacter
- Pseudonocardia
- Psychrobacillus
- Saccharopolyspora
- Streptomyces
- Terribacillus
- Viridibacillus



## 第四 下步工作计划



# 下步工作计划

1 继续开展菌株的抗菌活性实验。

---

2 对得到的纯培养数据和免培养数据深入分析和讨论。

---

# 敬请各位老师批评指正！

