

川滇四区森林土壤纯培养放线菌多样性及生物活性

曹艳茹, 姜怡*, 王茜, 赵立兴, 靳荣线, 姜成林

(云南大学云南省微生物研究所, 微生物药物国家工程研究中心, 昆明 650091)

摘要:【目的】为了从放线菌发现新的药物先导化合物, 研究了川滇 4 个地区的放线菌多样性及其生物活性。【方法】采集 250 份土样, 用 4 种培养基分离放线菌; 从中选择 98 株代表菌进行了初步分类鉴定; 采用琼脂扩散法, 检测了 169 株放线菌对 4 种细菌和 7 种真菌的抑菌活性; 利用特异性引物扩增法, 测定了它们产生的聚酮合酶(PKSI、PKS II)基因、非核糖体多肽合成酶(NRPS)基因和多烯类化合物合成酶(CYP)基因。【结果】黄荆老林的放线菌有 13 个属, 峨眉山、青城山仅 5 个属, 九寨沟 9 个属, 西双版纳达 20 个属; 不同地区的放线菌具有抗菌活性的菌株平均约占 10%; 有 27% - 36% 的菌株产生 PKSI、II、NRPS、CYP 化合物合成基因。【结论】在采集样品的地区中, 人类干扰越少, 放线菌的多样性越高。分离放线菌时, 使用“极端”条件, 虽然分离到的放线菌数量可能不多, 但获得未知菌的比例较大。添加抑制剂可减少革兰氏阴性细菌和真菌, 有利于分离放线菌。

关键词: 放线菌组成; 多样性; 化合物合成基因; 抗菌活性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-06-0995

放线菌是产生天然药物最多的一类微生物。目前在临床及农业上应用的抗生素有四分之三是用放线菌生产的^[1]。同时放线菌在自然生态系统中具有重要的生态功能。根据国内外的研究结果, 迄今尚有 90% 以上的微生物不能够纯培养^[2-5], 放线菌亦然。早在 2004 年焦瑞身^[6]就指出, 分离未培养的微生物是新世纪微生物学家的一项重要任务。本文对川、滇 4 个地区森林土壤放线菌的多样性及生物活性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

PCR 仪 (Biometra, Germany); 电泳仪 (Bio-Rad, USA); 聚酮合酶 (PKSI 和 II) 基因、非核糖体含硫多肽合酶 (NRPS) 基因和多烯合酶 (CYP) 合成基因引物、溶菌酶、蛋白酶 pK、dNTPs、Taq 酶等购自上海生

工生物工程技术有限公司, Marker 购自宝生物工程 (大连) 有限公司。以下分离培养基中提及所有试剂均为国产分析纯试剂: YIM 7^[7]、YIM 37^[8]、YIM 171^[9]、YIM 212^[10], 制霉菌素、放线菌酮、奈啶酮酸、利福平。

1.2 样品采集及预处理

从四川古蔺黄荆老林采集土样 50 份 (pH 5.5 - 7.2), 从峨眉山、青城山采集土样各 50 份 (pH 5.8 - 7.0), 从九寨沟采集 50 份 (pH 6.2 - 7.8); 从云南西双版纳采集 50 份 (pH 5.0 - 6.5)。每份样品收集 5 个洞穴 (深 5 - 20 cm) 的土壤混合, 放于封口袋, 置 4℃。实验前土样在室温风干 7 d, 80℃ 干热处理 1 h。

1.3 分离培养基及平板稀释法

YIM 7^[7] (加 KCl 1 g/L), 加制霉菌素 100 mg/L, 奈啶酮酸 25 mg/L。YIM 37^[8], 加利福平

基金项目: 国家自然科学基金 (30900002, 30560001, 30600001); 国家科技部重点国际合作项目 (2006DFA33550)

* 通信作者。Tel: +86-871-5034139; Fax: +86-871-5173878; E-mail: jiangyikm@hotmail.com

作者简介: 曹艳茹 (1983 -), 女, 内蒙古人, 博士研究生, 从事放线菌资源研究。E-mail: yanrucao3@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2009-11-25; **修回日期:** 2010-02-06

25 mg/L, 制霉菌素 100 mg/L, 放线菌酮 50 mg/L, 奈啉酮酸 25 mg/L。YIM 171^[9] (改良甘油-门冬酰胺培养基): 甘油 10 mL, 门冬酰胺 1 g, K₂HPO₄ · 7H₂O 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, CaCO₃ 0.3 g, HV 培养基^[7] 的混合维生素 3.7 mg, K₂Cr₂O₇ 50 mg/L。YIM 212^[10], 加制霉菌素 100 mg/L, 放线菌酮 50 mg/L, 奈啉酮酸 25 mg/L。平板涂布, 28℃ 培养 7-30 d 后, 挑取单菌落于斜面培养基, 28℃, 培养 7 d。

1.4 菌种鉴定

菌株的细胞培养, DNA 提取, PCR 及 16S rRNA 基因的序列分析按照以前的文献进行^[11]。菌株鉴定到属的水平。

1.5 抑菌实验及 4 类化合物合成基因筛选

放线菌株对 4 种细菌和 6 种农作物致病真菌及 1 种非致病真菌的抑菌实验及产生聚酮合酶 (PKSI 和 II) 基因、非核糖体含硫多肽合酶 (NRPS) 基因、多烯合酶 (CYP) 基因均按前文^[12]使用的方法进行。实验菌株为 *Escherichia coli* (DSM 30083^T), *Staphylococcus aureus* (NBRC 100910^T), *Bacillus subtilis* (NBRC 16412^T), *Bacillus megaterium* (CCRC

10608^T), *Aspergillus niger* (IAM 190^T), 以下菌株 *Phytophthora nicotianae*, *Alternaria alternate*, *Fusarium sp.*, *Colletotrichum sp.*, *Gonmatopyricularia amomi*, *Protomyces macrosporus*, 都来自云南省农科院植保所。

2 结果

2.1 4 种培养基的分离效果

表 1 是 4 种培养基分离 250 份土样的结果。共分离到放线菌 2676 株。用 YIM 171 培养基共分离到 1207 株放线菌, 链霉菌占 63%, 其他放线菌占 37%。而 YIM 7、YIM 37 和 YIM 212 分离到的链霉菌分别占 46%、48% 和 31%。由此看出, YIM 171 比较适合于分离链霉菌, 其它 3 种培养基更适合于分离稀有放线菌。值得一提的是 50 mg/L 的重铬酸钾 (K₂Cr₂O₇) 对真菌和细菌都有很好的抑制效果, 一直到分离纯菌株时, 几乎没有一个培养皿长真菌, 给分离纯菌落带来很大方便。所以重铬酸钾是一种效果好、经济、使用方便的真菌、细菌抑制剂, 建议用于放线菌的分离。

表 1 四种培养基分离的放线菌菌株数

Table 1 Amount of isolated actinomycete strains from soil samples collected from four areas

Sampling area	YIM 171		YIM 7 (HV)		YIM 37		YIM 212	
	Streptomycete	Other	Streptomycete	Other	Streptomycete	Other	Streptomycete	Other
Forest of Huangjing	187	78	168	273	26	30		
Emei' & Qingcheng Mountains	458	258	128	73	70	59		
Jiuzhaigou	120	106	43	85	55	73		
Xishuangbanna			105	81			61	139
Total	765	442	444	512	151	162	61	139
%	63	37	46	54	48	52	31	69

2.2 放线菌的多样性

2.2.1 黄荆老林放线菌的组成: 黄荆老林位于四川古蔺, 北纬 28°, 采样地的海拔 720-1720 m。植被属于亚热带常绿阔叶林, 主要代表性植物有川西栎 (*Quercus gilliana*)、扁刺锥 (*Castanopsis platyacantha*)、樟树 (*Cinnamomum camphora*)、楠属 (*Phoebe sp.*)、华山松 (*Pinus armandii*)、中国鹅掌楸 (*Liriodendron chinensis*)、柏属 (*Fokienia sp.*)、红花荷 (*Rhodoleia sp.*)、宜昌楠 (*Machilus ichangensis*)、箭竹 (*Sinarundinaria nitida*) 和桫欏 (*Cyathea spinulosa*) 等^[13]。从所采集的 50 份土样分离到放线菌 762 株, 用于生物活性的高通量筛选。其中 24 株用 16S rRNA 基因序列分析进行鉴定, 它们属于 7 个亚目, 8 个科, 13 个属: 马杜拉放线菌属 (*Actinomadura*)、多形放线菌属 (*Actinopolymorpha*)、分枝杆菌属

(*Mycobacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、野野村氏菌属 (*Nonomurae*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*)、糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardoides*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和疣孢菌属 (*Verrucosipora*) (树图未显示)。其中 YIM 48941 与多形放线菌属已知种的 16S rRNA 基因的相似性低于 97%, 应该是个新种, 有关工作另行发表。

2.2.2 峨眉山和青城山放线菌的组成: 峨眉山位于四川盆地西沿, 北纬 29°, 取样地海拔 520-3080 m。大多数森林属于次生亚热带常绿阔叶林, 人类对该地区的生态环境干扰较多, 主要植物有珙桐 (*Davidia involucrata*)、桫欏、锥属 (*Castanopsis*

platryacantha)、冷杉(*Abies ceratacantha*)、宜昌楠。青城山处四川盆地西北部,北纬 31°, 取样地 570 - 1120 m。代表植物有栎属、锥属(*Castanopsis*)、柯属(*Lithocarpus*)、青冈属(*Cyclobalanopsis*)、松属、杉木属(*Cunninghamia*)、桧属(*Juniperus*)、园柏属(*Sabina*)、冷杉属和箭竹属等属植物^[13]。从这两处采集的 100 份土样分离到 1046 株, 鉴定了其中 25 株, 属于放线菌的 5 个属, 分枝杆菌属、诺卡氏菌属、原小单孢菌属、指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)和链霉菌属, 都是比较常见的放线菌(树图未显示)。这是本研究中放线菌区系最为单调的地区。

2.2.3 九寨沟放线菌的组成:九寨沟是著名的风景区,地处四川北部,北纬 34°, 海拔 1500 - 3100 m。代表性植物有云杉属(*Picea*)、冷杉属、落叶松属(*Larix*)、柳属(*Salix*)、栎属、杜鹃属(*Rhododendron*)和冷杉属等^[13]。从采集的 50 份土样分离到放线菌 482 株, 鉴定了其中 19 株, 属于 9 个属, 马杜拉放线菌属、分枝杆菌属、原小单孢菌属、姜氏菌属(*Jiangella*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)、小单孢菌属、野野村氏菌属、假诺卡氏菌和链霉菌属(树图未显示)。姜氏菌属和韩国生工菌属两个属比较少见。

2.2.4 西双版纳放线菌的组成:西双版纳位于云南南部,在北纬 21.5° 和东经 101° 之间, 年均温 23.8°C, 年均雨量 1500 mm。采样地区海拔 430 - 860 m, 属于原始热带雨林, 以龙老香科的望天树(*Parashoria*)、隐翼科的隐翼(*Crypteronia*)、四数木科的四数木(*Tetrameles*)为特征植物。这是我国生物多样性最为丰富的地区。从采集的 50 份土样分离到 386 株放线菌, 鉴定了其中 30 株, 属于 10 个科

20 属: 游动放线菌属(*Actinoplanes*)、马杜拉菌属、多形放线菌属、指孢囊菌属、弗莱德门菌属(*Friedmanniella*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)、伦茨氏菌属(*Lentzea*)、小单孢菌属、微杆菌属(*Microbacterium*)、诺卡氏菌属、拟诺卡氏菌属、野野村氏菌属、游动孢囊菌属(*Planosporangium*)、原小单孢菌属、假诺卡氏菌属、红球菌属、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、球孢囊菌属(*Sphaerisporangium*)、链霉菌属和链孢囊菌属(*Streptospirangium*)。其中球孢囊菌属^[13]和游动孢囊菌属^[14]是新近发表的新属。菌株 YIM 48875 可能是球孢囊菌属的新种。

根据 16S rRNA 基因系统进化分析和 DNA-DNA 杂交的结果, 一个菌株与已知菌的 16S rRNA 基因序列相似性低于 98.5%, 其新种的可能性约 80%^[15]。本研究鉴定的 98 个菌株中有 35 株与已知菌的 16S rRNA 基因的序列相似性低于 98.5%。换言之, 有 36% 的菌株可能是潜在新种。这几个地区具有很高的放线菌多样性。

2.3 抗菌活性

测定了 169 株放线菌对 1 株革兰氏阴性细菌、3 株革兰氏阳性细菌、6 株农作物致病真菌和 1 株非致病真菌的抗菌活性, 结果示于表 2。58 株来自黄荆老林的放线菌有 11 株能抑制 *Bacillus megaterium*, 有 8 株能抑制 1 至 3 种细菌和 1 至 4 种致病真菌, 所有 58 株都不抑制 *Colletotrichum* sp.。来自峨眉山和青城山的 53 个菌株有 13 株抑制 *Bacillus subtilis*, 10 株抑制 *Bacillus megaterium*; 其中 9 株抑制 1 至 3 种细菌和 1 至 5 种致病真菌的活性

表 2 具有抗菌活性的菌株数

Table 2 Number of positive strains with Antimicrobial activities

Antimicrobial activities	Forest of Huangjing		Emei & Qingcheng Mountains		Jiuzhaigou	
	Streptomycete	Other	Streptomycete	Other	Streptomycete	Other
Tested strain number	32	26	36	17	40	18
Number of positive strains:						
<i>Escherichia coli</i> DSM 30083 ^T	2	0	2	0	2	1
<i>Staphylococcus aureus</i> NBRC 100910 ^T	5	3	5	2	13	3
<i>Bacillus subtilis</i> NBRC 16412 ^T	5	2	9	4	9	6
<i>Bacillus megaterium</i> CCRC 10608 ^T	6	5	8	2	12	6
<i>Phytophthora nicotianae</i>	6	2	4	1	7	1
<i>Alternaria alternata</i>	6	1	6	2	5	3
<i>Fusarium</i> sp.	5	0	6	1	4	0
<i>Colletotrichum</i> sp.	0	0	6	0	3	0
<i>Gonmatopyricularia amomi</i>	1	0	4	0	3	1
<i>Protomyces macrosporus</i>	2	0	2	0	3	0
<i>Aspergillus niger</i> IAM 190 ^T	2	1	3	1	3	2
Average % of positive strains	12	5	14	7	15	12

高。58 株来自九寨沟的菌株有 16 株抑制 *Staphylococcus aureus*, 15 株抑制 *Bacillus subtilis*; 其中 12 株抑制 1 至 3 种细菌和 1 至 8 种致病真菌的活性高; YIM 48915 (*Streptomyces* sp.) 对 2 种细菌和 7 种致病真菌有很好的抑制活性; YIM 100296 (*Streptomyces* sp.) 对 2 种细菌和 8 种真菌的抑制活性高。YIM 100296 (*Streptomyces* sp.) 对 2 种细菌和 8 种真菌的抑制活性高。黄荆老林、九寨沟、峨眉山

和青城山地区据有抗菌活性的链霉菌分别占实验菌株总数的 12%、15% 和 14%, 均高于其它放线菌。

2.4 四种化合物合成基因的筛选结果

58 株放线菌产生 4 种化合物合成基因的测定结果示于表 3。从表 3 的结果可以看出, 从 3 个地区来的放线菌平均有 27%、29%、36%、34% 的菌株分别产生 PKS I、PKS II、NRPS、CYP 基因。

表 3 产生 4 类地化合物合成基因的菌株数

Table 3 Number of positive strains with synthesis genes of four metabolites

Synthesis genes of metabolites	Forest of Huangjing	Emei' & Qingcheng Mountains	Jiuzhaigou	Total	Average of positive strains/%
Number of test	20	15	23	58	100
Number of positive strains					
PKS I	5	5	6	16	27
PKS II	4	4	9	17	29
NRPS	5	7	9	21	36
CYP	6	5	9	20	34

3 讨论

根据大量微生物基因组研究的结果, 一个放线菌的全基因组大约包含 8000 个左右编码蛋白质的基因和 20 - 50 个左右的次生代谢产物合成基因簇^[16, 17]。一个放线菌新物种应该含有足够合成 1 种以上新化合物的新基因。换言之, 获得新物种是获得新次生代谢产物的重要前提之一^[18]。如何获得新物种? 根据我们几十年的经验和本文的结果, 我们认为:

(1) 到原始环境中采样最好。表 4 的比较结果说明, 从西双版纳原始热带雨林分离到的放线菌达 20 个属, 其中多形放线菌属、弗莱德门菌属、韩国生工菌属、伦茨氏菌属、游动孢囊菌属是很少常见的属。大香格里拉广布原始森林, 从那里分离到 17 个属^[19]; 从武陵山原始林也分离到 13 个属^[12]。本室研究员等专门研究过云南同一地区不同植被放线菌的生态分布, 结果发现, 放线菌种属的组成越来越单一而且是常见菌; 放线菌多样性按原始森林、次生林、荒地、耕作地的顺序逐渐降低; 砍伐后种植作物

表 4 不同地区放线菌组成的比较

Table 4 Comparison of actinomycetes among different areas

Area	Genera of isolated actinomycetes	References
Forest of Huangjing (黄荆老林)	<i>Actinomadura</i> , <i>Actinopolymorpha</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nocardioidea</i> , <i>Nonomurae</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharomonospora</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Verrucosipora</i>	This study
Emei' & Qingcheng Mountains (峨眉山和青城山)	<i>Dactylosporangium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Streptomyces</i>	This study
Jiuzhaigou (九寨沟)	<i>Actinomadura</i> , <i>Jiangella</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nonomurae</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Streptomyces</i>	This study
Xishuangbanna (西双版纳)	<i>Actinoplanes</i> , <i>Actinomadura</i> , <i>Actinopolymorpha</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Friedmanniella</i> , <i>Kribbella</i> , <i>Lentzea</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nocardioidea</i> , <i>Nonomurae</i> , <i>Planosporangium</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Sphaerisporangium</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Streptosporangium</i>	This study
Wuling Mountain (武陵山)	<i>Actinomadura</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Catellatospora</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nonomurae</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphaerisporangium</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Streptosporangium</i>	[12]
Grand Shangri-La (大香格里拉)	<i>Actinomadura</i> , <i>Actinopolymorpha</i> , <i>Agromyces</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Lentzea</i> , <i>Mycetocola</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nocardioidea</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Tsakamurella</i>	[19]
Qinghai (青海)	<i>Citricoccus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Isoptricola</i> , <i>Jiangella</i> , <i>Marinococcus</i> , <i>Myceligerans</i> , <i>Nesterenkonia</i> , <i>Nocardioopsis</i> , <i>Prauserella</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharomonospora</i> , <i>Salinimicrobium</i> , <i>Streptomonospora</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Yania</i> , <i>Zhihengliuella</i> , <i>Sinococcus</i> , <i>Sinocurtobacterium</i> , <i>Alkalibacillus</i> , <i>Naxibacter</i>	[21]

的地区,即使在西双版纳的橡胶林,其多样性也很低,且大多为常见链霉菌^[20]。需要指出的是,原始的极端环境放线菌数量并不太多,但蕴涵的新物种却很多。我们从青海重盐土分离到16个属的放线菌,其中阎氏菌科(*Yaniaeace*)为新科,还发现姜氏菌属、产丝菌属(*Myceligererans*)、链单孢菌属(*Streptomonospora*)、阎氏菌属(*Yania*)、刘氏菌属(*Zhihengliuella*)等4个新属及4个其他细菌新属——中华球菌属(*Sinococcus*)、中华短杆菌属(*Sinocurtobacteriu*)、碱杆菌属(*Alkalibacillus*)和纳西杆菌属(*Naxibacter*),还有30多个放线菌新种都在国际微生物分类杂志有效发表^[21]。可见保护原始森林(尤其是热带雨林)和原始环境对于保护生物多样性的的重要性。而越是远离人类的或是生态环境得到有效保护的地区,如许多风景名胜景区、西双版纳的望天树公园,虽然有游人和垃圾污染等因素存在,但是由于得到当地政府有力支持和景区的规范管理,动植物(微生物)们怡然自得的生活在它们出生的地方,由此生物多样性也得到保护和延续。云南素有动植物王国之称,但由于经济发展和当地人民需求,许多热带雨林并未得到有效保护反而种上单一经济作物。前面提到的望天树公园就像一个孤岛,站在望天树之间的缆绳栈道上远处都是橡胶林海。中国西南地区也是全世界生物多样性极高的地区之一,在这些地区许多森林是因为发展绿色无污染经济而得以保护,但这样形成的一个个“孤岛”,除去动植物成分单调、系统结构简单等不说,对整个热带雨林生态系统的影响显而易见,对遗传、物种和生态多样性的提高也可能起消极作用。

(2)分离方法非常重要。分离方法绝不是简单的技术,而是一门高超的艺术。何谓好的分离方法?在这里指的就是能够分离到尽可能多的未知菌、又能尽量减少已知菌出现率的方法。而未知菌和已知菌是不断消涨的。今天是未知菌,明天就可能成为已知菌。根据国内外的经验,很难设计出对所有样品都“好”的分离方法。例如Wasu等^[22]用20个培养基,分离Mariana Trench海域万米以下采集的底泥样品,结果是一个老培养基(棉子糖-组氨酸培养基)^[10]的分离效果最好。我们经过反复改进的YIM 212培养基分离到的稀有放线菌约占2/3以上,上述其它3种培养基也都是经过改良的。在分离极端环境样品的放线菌时,我们主张使用“极端”的分离条件,如60℃以上的高温,4℃以下低温,pH 4以下、11以上,25%的盐,等等;在这些条件下,可

能分离到的放线菌数量并不多,但未知菌的比例大。放线菌酮、制霉菌素、萘啶酮酸混合液或重铬酸钾等都是比较好的真菌、革兰氏阴性细菌的抑制剂。分离方法本身应该作为研究的主要内容之一,因研究目的、样品的不同,不断创新、改进、变换。

(3)一些作者用Un-culturable^[2,4]一词来描述那些至今还没有获得纯培养的微生物,这容易引起误解,我们建议用Un-cultured来代替。未培养微生物无穷,它们是微生物资源开发的不竭源泉,探索获得未知微生物的工作应该加强。

参考文献

- [1] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites, a personal review. *Journal of Antibiot*, 2005, 58(1): 1-26.
- [2] Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, et al. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environment Microbiology*, 2001, 67: 4399-4006.
- [3] Joseph SJ, Hugenholtz P, Sangwan P, Osborne CA, Janssen PH. Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Applied and Environment Microbiology*, 2003, 69: 7210-2715.
- [4] Pachter L. Interpreting the unculturable majority. *Nature. Methods*, 2007, 4: 479-80.
- [5] Zengler K, Toledo G, Rappe M, et al. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2002, 99: 15681-15686.
- [6] 焦瑞身. 新世纪微生物学者的一项重要任务—未培养微生物的分离培养. *生物工程学报(Chinese Journal of Biotechnology)*, 2004, 20: 641-645.
- [7] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65: 501-509.
- [8] 姜成林,徐丽华. 微生物资源学. 北京:科学出版社, 1997.
- [9] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16: 313-340.
- [10] 姜怡,唐蜀昆,陈华红,等. 稀有放线菌分离方法. *微生物学通报(Microbiology)*, 2006, 33(1): 181-183.
- [11] Jiang Y, Wiese J, Tang SK, et al. *Actinomycetospira chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Pseudonocardiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58: 408-13.
- [12] 曹艳茹,姜怡,陈义光,等. 武陵山放线菌多样性. *微生物学报(Acta Microbiol Sinica)*, 2008, 48(7): 1-7.
- [13] Ara I, Kudo T. *Sphaerosporangium* gen. nov., a new member of the family Streptosporangiaceae, with descriptions of three new species as *Sphaerosporangium*

- melleum* sp. nov., *Sphaerosporangium rubeum* sp. nov. and *Sphaerosporangium cinnabarinum* sp. nov., and Transfer of *Streptosporangium viridialbum* Nonomura and Ohara 1960 to *Sphaerosporangium viridialbum* comb. nov. *Actinomycetologica*, 2007, 21: 11-21.
- [14] Wiese J, Jiang Y, Tang SK, et al. A new member of the family *Micromonosporaceae*, *Planosporangium flavigriseum* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58: 1324-1331.
- [15] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学, 北京: 科学出版社, 2007.
- [16] Bentley SD, Chater KF, Cerden-Tarraga AM, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 2002, 417: 141-147.
- [17] Omura S, Ikeda H, Ishikawa J, et al. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 2001, 98: 12215-12220.
- [18] Jiang Y, Cao YR, Wiese J, et al. A new approach of research and development on pharmaceuticals from actinomycetes. *Journal of Life Science US*, 2009, 3(7): 52-56.
- [19] 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. *微生物学报 (Acta Microbiol Sinica)*, 2009, 49(1): 105-109.
- [20] 徐丽华, 杨宇容, 姜成林. 云南土壤放线菌生态分布的研究. *微生物学报 (Acta Microbiol Sinica)*, 1996, 36: 220-226.
- [21] 姜怡, 李文均, 徐平, 等. 盐碱环境放线菌多样性研究. *微生物学报 (Acta Microbiol Sinica)*, 2006, 46: 191-195.
- [22] Wasu PA, James EMS, Alan CW, et al. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*, 2006, 10: 181-189.

Diversity and bioactivity of cultured actinomycetes in Sichuan and Yunnan area

Yanru Cao, Yi Jiang*, Qian Wang, Lixing Zhao, Rongxian Jin, Chenglin Jiang

(Yunnan Institute of Microbiology, The National Engineering Center for Research of Microbial Pharmaceuticals, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: [**Objective**] In order to discover new leader compounds, the diversity and some bioactivities of cultured actinomycetes from Sichuan and Yunnan were studied. [**Methods**] In total 250 soil samples were collected from forest of Huangjin, Emei and Qingcheng Mountains, Jiuzhaigou in Sichuan, and Xishuangbanna in Yunnan. Actinomycetes in these samples were isolated and identified. Bioactivities of isolated strains were determined. [**Results**] In total 2676 strains of actinomycetes were isolated from these samples. The 16S rRNA gene sequences of 98 selected strains were determined, and the phylogenetic analysis was carried out. 13, 5, 9 and 20 genera were identified from Forest of Huangjin, Emei and Qingcheng Mountains (one sample area), Jiuzhaigou, and Xishuangbanna respectively. The diversity of Xishuangbanna was the richest. That of Emei and Qingcheng Mountains was monotone, and only five genera were isolated. Antimicrobial activities of 169 selected strains against 11 bacteria and fungi were tested using agar well diffusion method, and genes of type I and II polyketide synthases (PKS I, PKS II), non-ribosomal peptide synthase (NRPS) and polygene cytochrome P450 hydroxylase (CYP) were detected by PCR. High rate of antimicrobial activity and the synthesis genes of four antibiotic existed in these actinomycetes. [**Conclusion**] In sample-collecting areas, the poorer human beings disturbance, the richer the diversity of actinomycetes. For isolation of actinomycetes, author advocate using of "extreme" conditions, although it may got small number of actinomycetes, but the proportion of unknown actinomycetes was greater. Gram-negative bacteria and fungi could be inhibited by adding inhibitors in media.

Keywords: actinomycete; diversity; biosynthesis genes; anti-microbial activity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900002, 30560001, 30600001) and the International Cooperative Program of the Ministry of Science of Technology of China (2006DFA33550)

* Corresponding author. Tel: +86-871-5034139; Fax: +86-871-5173878; E-mail: jiangyikm@hotmail.com

Received: 25 November 2009/ Revised: 6 February 2010