

鹭宁两地植物根际土壤中放线菌的 生物多样性分析及生物活性检测

王 霏¹, 黎 丹¹, 黄耀坚¹, 邓贤明¹, 吴莹莹^{2*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 天然产物源靶向药物国家地方联合工程实验室, 福建 厦门 361102;

2. 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201406)

摘要: 为探究不同地区植物根际土壤中可培养放线菌的多样性, 筛选具有抗菌及抗肿瘤活性的药源菌株, 采用改良聚乳酸-明胶和海藻糖-脯氨酸 2 种培养基, 选择分离来自厦门市翔安区香山风景区、南京市中山植物园及玄武湖公园的 17 份植物根际土壤样品中的放线菌, 并进行 16S rRNA 基因鉴定、系统进化分析及抗菌和抗肿瘤生物活性测定. 共分离到 178 株放线菌, 其中链霉菌 151 株, 其余 27 株为稀有放线菌, 占总数的 15.2%. 稀有放线菌分布在 9 个属中: 微杆菌属 (*Microbacterium*)、拟无枝酸菌属 (*Amycolatopsis*)、韩国生工菌属 (*Kribbella*)、野野村氏菌属 (*Nonomuraea*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、链孢囊菌属 (*Streptosporangium*)、拟孢囊菌属 (*Kibdelosporangium*)、纤维微菌属 (*Cellulosimicrobium*) 和栖白蚁菌属 (*Isoptericola*), 包含 2 株新种. 对分离得到的所有放线菌进行液体小量发酵, 并测定其发酵粗提物的抗菌和抗肿瘤活性. 结果显示: 所测定的 178 株放线菌中, 有 82 株对一种或多种指示菌表现出抗菌活性, 占供测菌株的 46.1%; 有 60 株对一种或多种肿瘤细胞具有抑制作用, 占供测菌株的 33.7%. 研究结果表明植物根际土壤中放线菌资源丰富, 其中抗菌和抗肿瘤活性较强的菌株可为后续微生物药物研发提供有利资源.

关键词: 放线菌; 选择分离; 生物多样性; 生物活性

中图分类号: Q 939

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2017)04-0511-06

放线菌是天然药物的重要来源, 目前临床及农业上使用的抗生素中, 超过 60% 是放线菌产生的^[1]. 自 1944 年美国放线菌学家 Walksman 从灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 中发现链霉素^[2] 以来, 大量新型抗生素陆续从放线菌中分离得到, 其中大部来自链霉菌, 约占自然界来源抗生素总数的 45%^[3]. 随着对链霉菌资源的开发, 从中发现结构新颖的活性物质的概率不断下降. 近年来, 人们逐渐将探索的目光转向非链霉菌属的放线菌, 即稀有放线菌^[4]. 稀有放线菌产生的生物活性物质结构类型丰富, 包含大环内酯类、氨基糖苷类、肽类、萜环类、氧杂萜酮类等^[5-6], 其中如抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的万古霉素 (vancomycin)、替考拉宁 (teicoplanin)、道古拉宁 (dalbavancin), 治疗细菌感染的庆大霉素 (gentamicin)、红霉素 (erythromycin), 抗结核杆菌的利福霉素 (rifamycin)

cin)、卷曲霉素 (capreomycin), 以及降糖药阿卡波糖 (acarbose) 等已经成功应用于临床^[7].

植物根际土壤是微生物的重要栖息地, 它是由植物、土壤和微生物共同构成的一个微环境, 三者之间相互作用、相互影响. 已有研究表明, 植物根际土壤中的微生物多样性比非植物根际土壤中的丰富^[8]. 根际微生物的代谢活动对于整个微环境中的碳循环、磷循环、植物固氮作用、植物根际微环境的调节以及土壤中废物和毒素的清除都起到十分重要的作用^[9]. 放线菌在植物根际土壤微生物类群中占有极其重要的地位, 如在玉米等农作物的根际土壤中, 放线菌属于优势菌, 其含量仅次于变形杆菌^[9]. 因此, 本研究选择采集自鹭宁两地的植物根际土壤样品作为放线菌的分离源, 对分离到的放线菌菌株进行分类鉴定和系统进化分析, 并对其进行抗菌和抗肿瘤活性筛选, 旨在了

收稿日期: 2016-06-07 录用日期: 2016-09-02

基金项目: 国家自然科学基金 (U1405223); 福建省教育厅科技项目 (JA15020)

*通信作者: wuyingying@xmu.edu.cn

引文格式: 王霏, 黎丹, 黄耀坚, 等. 鹭宁两地植物根际土壤中放线菌的生物多样性分析及生物活性检测[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2017, 56(4): 511-516.

Citation: WANG F, LI D, HUANG Y J, et al. Biodiversity analysis and bioactivity detection of actinomycetes from rhizosphere soil in Xiamen and Nanjing area, China[J]. J Xiamen Univ Nat Sci, 2017, 56(4): 511-516. (in Chinese)



<http://jxmu.xmu.edu.cn>

解植物根际土壤中放线菌的多样性,挖掘新的稀有放线菌分类单元,并获得可用于活性物质分离的药源菌株,为后续微生物药物资源的开发奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品来源

植物根际土壤样品分别采集自福建省厦门市(2012年10月)和江苏省南京市(2012年11月);其中以X开头的9份样品采自厦门市翔安区香山风景区(24°37'45.84" N, 118°17'56.73" E),分别为植物飞扬草(*Euphorbia hirta* L.)、榕树(*Ficus microcarpa* Linn. f.)、红薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.)、鬼针草(*Bidens pilosa* L.)、马樱丹(*Lantana camara* L.)、阴香(*Cinnamomum burmannii*)、紫茉莉(*Mirabilis jalapa* L.)、红花檵木(*Loropetalum chinense* var. *rubrum*)和凤凰木(*Delonix regia*)的根际土壤;以N开头的8份样品采自南京市,分别为中山植物园(32°03'10.48" N, 118°49'40.66" E)中水杉(*Metasequoia glyptostroboides*)、桫欏(*Alsophila spinulosa*)、鹅掌楸(*Liriodendron chinense*)和金钱松(*Pseudolarix amabilis* (Nelson) Rehd.)的根际土壤,以及玄武湖公园(32°04'27.36" N, 118°47'19.58" E)中罗汉松(*Podocarpus macrophyllus*)、枫杨(*Pterocarya stenoptera* C. DC.)、朴树(*Celtis sinensis* Pers.)和喜树(*Camptotheca acuminata*)的根际土壤。

1.2 主要试剂和仪器

提取放线菌基因组DNA所用的溶剂按照《分子克隆实验指南》^[10]进行配制。PCR所用的dNTP Mixture、Taq酶及琼脂糖凝胶电泳所用的DNA分子质量标记等购于宝生物工程(大连)有限公司。Avanti J-30 I型高速冷冻离心机购于美国Beckman公司, Tprofessional型PCR仪购于德国Biometra公司, Tanon GIS-2009型凝胶图像分析系统购于上海天能科技有限公司, DYY-8C型电泳仪购于北京六一仪器厂。

1.3 放线菌的分离

1.3.1 样品预处理

参考姜怡等^[4]的方法,将采集好的土样分别摊开于通风处自然风干20~30 d(视土样湿度而定),用研钵将其研细,之后过200目的筛子,收集至自封袋,妥存。称取1 g样品装入盛有9 mL无菌水和小玻璃珠的50 mL无菌离心管中,摇床充分振荡后制成 10^{-1} 稀

液,再以相同方法制备土壤样品的 10^{-2} 和 10^{-3} 梯度稀释液,用于涂布选择分离培养基。

1.3.2 选择分离

分别使用改良聚乳酸-明胶(PLA-G)^[11]和海藻糖-脯氨酸(YIM212)^[12]培养基对土样进行放线菌的选择分离。培养基中加入重铬酸钾、制霉菌素、放线菌酮至终质量浓度50 mg/L,再加入萘啶酮酸至终质量浓度25 mg/L。涂布平板,倒置于28℃恒温培养箱中培养14~21 d后,挑取单菌落于高氏I号^[13]平板进行纯化。

1.4 放线菌的鉴定

1.4.1 形态分类排重

根据在固体培养基上生长菌落的形状和颜色、是否产孢子、是否产可溶性色素等特征对所分离到的菌株进行形态分组。

1.4.2 16S rRNA 基因扩增及序列分析

将纯化后的菌株接种至25 mL胰蛋白胨大豆肉汤-酵母提取物(TSBY)液体培养基中,于28℃,220 r/min摇瓶培养3~4 d。采用吴莹莹等^[14]的方法提取各菌株的基因组DNA。采用通用引物27F和1492R扩增菌株的16S rRNA基因,并送至英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。测序结果提交至在线分析网站EzTaxon-e(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)进行相似性搜索,获得同源性相近的菌种序列。运用MEGA 6.06^[15]的邻接(NJ)法构建系统进化树^[16],确定放线菌的分类地位。对于最近似菌株的序列相似度低于98%且分类地位独特的,用宝生物工程(大连)有限公司的高保真酶对16S rRNA基因再次扩增测序。

1.5 生物活性检测实验

1.5.1 放线菌发酵粗提物的制备

采用酵母-麦芽提取物(ISP2)^[17]液体培养基进行发酵,每株菌发酵200 mL,于28℃,220 r/min培养7 d。乙酸乙酯萃取发酵液2遍,萃取液用旋转蒸发仪45℃减压浓缩成膏状物,称量后以甲醇定容至20 mg/mL,作为活性测定的母液。

1.5.2 抗菌活性测定

采用滤纸片法^[18]对分离得到178株放线菌的小量发酵粗提物进行抗菌活性测定。指示菌包括金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC25923)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* ATCC9372)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus* CMCC63202)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* ACCC41016)、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium*

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

bacterium tuberculosis)、大肠杆菌(*Escherichia coli* ATCC25922)、黑曲霉(*Aspergillus niger* ACCC3000-5)和白色假丝酵母(*Candida albicans* As2.538)。

1.5.3 抗肿瘤活性测定

抗肿瘤活性采用噻唑兰(MTT)法^[19]检测,分别选用人胃腺癌细胞 BGC-823、人肝癌细胞 HepG-2、人乳腺癌细胞 MCF-7 和人肺癌细胞 A549 作为指示细胞株,粗提物样品的测定终质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,传代培养至肿瘤细胞密度约为 $6 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 。样品孔及阳性、阴性对照孔内各加入 80 μL 细胞悬液,空白对照孔加入 80 μL 培养液,每个样品进行 3 组平行测定。置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 1.5% (体积分数) CO_2 培养箱内培养 24 h,加入待测样品。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续培养 72 h,每孔加入 10 μL 5 mg/mL MTT 溶液,反应 3~4 h 后加入 100 μL 终止液。9~12 h 后,用酶标仪测定吸光度值(波长 595 nm),并计算样品对肿瘤细胞的抑制率。

2 结果与分析

2.1 不同培养基的分离效果

使用 2 种选择培养基,经分离纯化共得到 178 株放线菌:其中 148 株分离自 PLA-G 培养基,占总数的 83.1%,经 16S *rRNA* 基因鉴定有 26 株(17.6%)为稀有放线菌;30 株分离自 YIM212 培养基,占总数的 16.9%,其中仅 1 株(3.3%)为稀有放线菌。观察发现,PLA-G 分离平板上的放线菌数量和种类都比较丰富,且细菌和真菌等杂菌污染较少;而在相同培养条件下,同一份土样在 YIM212 分离平板上长出的放线菌数量较少且种类单一,并出现较大范围的细菌污染。由此可见,PLA-G 培养基对于放线菌的筛选效果优于 YIM212 培养基,稀有放线菌的出菌率也较高。

2.2 放线菌的多样性

178 株放线菌中,链霉菌有 151 株,其余 27 株为稀有放线菌,占总数的 15.2%。107 株分离自厦门香山的土壤样品,占总数的 60.1%,其中 22 株(20.6%)为稀有放线菌,分布于微杆菌属(*Microbacterium*)、拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)、野野村氏菌属(*Nonomuraea*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、链孢囊菌属(*Streptosporangium*)、拟孢囊菌属(*Kibdelosporangium*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)和栖白蚁菌属(*Isopterocola*) 9 个属;71 株分离自南京的土壤样品,占总数的 39.9%,其中 5 株(7.0%)为稀有放线菌,分布于微杆

菌属、小单孢菌属和链孢囊菌属 3 个属。选取分离所得各属的代表菌株及其同属的标准参考菌株,基于 16S *rRNA* 基因序列构建系统进化树,结果如图 1 所示。进一步采用多相分类的方法^[20]对可能属于新分类单元的 2 株稀有放线菌 XMU506^T (原始编号 X5-6) 和 XMU706^T (原始编号 X7-6) 进行新种鉴定,将其分别命名为马樱丹拟孢囊菌(*K. lantanae*)^[21]和紫茉莉韩国生工菌(*K. mirabilis*)^[22]。

2.3 生物活性检测

抗菌活性测定结果(表 1)显示:有 82 株放线菌对至少 1 株指示菌具有抑制作用(抑菌圈直径 $\geq 6 \text{ mm}$),占供测菌株总数的 46.1%;其中 37 株对一种或多种指示菌具有较强的抑制作用(抑菌圈直径 $\geq 9 \text{ mm}$),占供测菌株总数的 20.8%。上述的 37 株抗菌活性较强的菌株中包含 8 株稀有放线菌,分别为微杆菌属 2 株、拟无枝酸菌属 3 株、野野村氏菌属 2 株、链孢囊菌属 1 株,其中编号为 X2-6、X2-10 的 2 株拟无枝酸菌和编号为 X3-25 的链孢囊菌对多种指示菌都有明显的抑制作用(抑菌圈直径 $> 15 \text{ mm}$),其抗菌活性优于大多数链霉菌属菌株。分离到的放线菌主要对革兰氏阳性细菌(金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、藤黄微球菌、耻垢分枝杆菌)表现出抑制作用,其中抗枯草芽孢杆菌的菌株数目最多;对供测的革兰氏阴性细菌(大肠杆菌)几乎没有抗性;少部分菌株对真菌(黑曲霉和白色假丝酵母)具有抑制作用。

采用 MTT 法进行抗肿瘤活性测定的结果(表 2)显示:所分离的放线菌中有 60 株对至少一种肿瘤细胞株具有抑制作用(抑制率 $\geq 50\%$),占供测菌株总数的 33.7%;其中,对一种或多种指示细胞株表现出较强抑制作用(抑制率 $\geq 90\%$)的有 23 株,占供测菌株总数的 12.9%。上述的 23 株抗肿瘤活性较强的菌株中包含 2 株稀有放线菌,分别为野野村氏菌属 1 株和韩国生工菌属 1 株。

3 讨论

合适的培养基对于选择分离稀有放线菌具有重要意义。碳源是培养基的基本成分之一,寻找特殊的“稀有”碳源对于稀有放线菌的选择分离尤为重要。已有研究中多采用乳化的聚乳酸(PLA)作为分离培养基的碳源^[23-26],本研究中沿用前期建立的机械粉碎 PLA 的方法制备 PLA-G 培养基^[11]。采用 PLA-G 培养基从不同来源的植物根际土壤中共分离得到 148 株放线菌,且稀有放线菌出菌率高,分离效果远优于

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

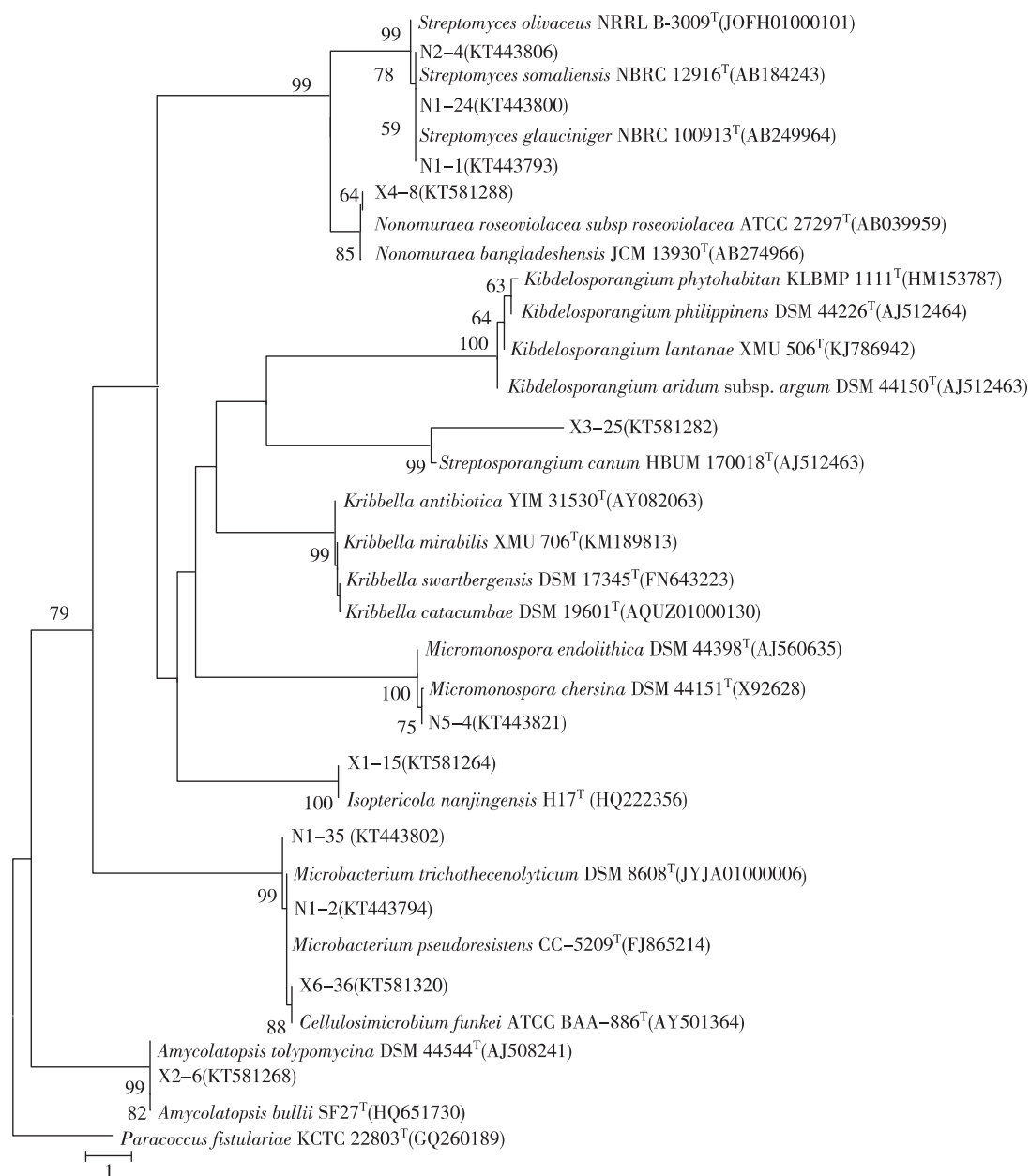


图 1 根据 16S rRNA 基因序列构建的植物根际土壤放线菌菌株系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of actinobacteria isolated from rhizosphere soil based on 16S rRNA gene sequences

表 1 178 株植物根际土壤放线菌的抗菌活性

Tab. 1 Antimicrobial activity of the 178 isolated actinomycetes from rhizosphere soil

抑菌圈直径/mm	活性菌株数(比例/%)	不同指示菌的抗性菌株数(比例/%)							
		<i>B. s</i>	<i>S. a</i>	<i>B. p</i>	<i>M. l</i>	<i>M. t</i>	<i>E. c</i>	<i>A. n</i>	<i>C. a</i>
≥6	82(46.1)	54(30.3)	51(28.7)	46(25.8)	46(25.8)	23(12.9)	0(0)	15(8.4)	9(5.1)
≥9	37(20.8)	34(19.1)	25(14.0)	24(13.5)	18(10.1)	12(6.7)	0(0)	8(4.5)	4(2.2)

注: *B. s*、*S. a*、*B. p*、*M. l*、*M. t*、*E. c*、*A. n*、*C. a* 分别表示枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、短小芽孢杆菌、藤黄微球菌、耻垢分枝杆菌、大肠杆菌、黑曲霉和白色假丝酵母。

YIM212 培养基及乳化的 PLA 培养基. 由此说明, 采用机械粉碎的 PLA 作为碳源制备的 PLA-G 培养基

优于 YIM212 培养基, 是选择分离植物根际土壤中稀有放线菌的一种优良培养基.

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

表2 178株植物根际土壤放线菌的抗肿瘤活性

Tab 2 Antitumor activity of the 178 isolated actinomycetes from rhizosphere soil

抑制率/%	活性菌株数 (比例/%)	不同肿瘤指示细胞株的抗性菌株数(比例/%)			
		BGC-823	HepG-2	MCF-7	A549
≥50	60(33.7)	54(30.3)	51(28.7)	46(25.8)	46(25.8)
≥90	23(12.9)	34(19.1)	25(14.0)	24(13.5)	18(10.1)

对本研究分离得到的178株放线菌进行16S rRNA基因序列分析结果表明,所有放线菌分布于7个科的10个属中,呈现出良好的多样性.其中107株分离自厦门市翔安区香山风景区的植物根际土壤样品,包含2株稀有放线菌新种,分离效果优于南京市采集的土壤样品,尤其是稀有放线菌的多样性较为丰富.香山风景区位于厦门市翔安区东南部,坐落于鸿渐山脉南麓的生态保护区和自然景观保护区,生态环境大多保持原始自然状态;南京市中山植物园和玄武湖公园属于旅游观光景区,生态环境受人类活动的影响较大.由此可见,未经开发或自然生态环境保持较好的生态系统,其植物根际土壤也保持着较原始的状态,其中可能蕴含着更丰富的微生物资源.

抗菌及抗肿瘤活性检测中,对至少一种指示菌和至少一种肿瘤细胞株具有抑制作用的活性菌株分别占供测菌株总数的46.1%和33.7%,进一步证明了所分离放线菌的次级代谢产物中可能蕴含着生物活性良好的化合物,具有极大的开发潜力.

参考文献:

- [1] JÁNOS B. Bioactive microbial metabolites: a personal review[J]. *Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1-26.
- [2] WALKSMAN S A. Streptomycin: background, isolation, properties and utilization[J]. *Science*, 1953, 118(3062): 259-266.
- [3] TIWARI K, GUPTA R K. Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2012, 32(2): 108-132.
- [4] 姜怡, 段淑蓉, 唐蜀昆, 等. 稀有放线菌分离方法[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(1): 181-183.
- [5] 李一青, 李艳琼, 李铭刚, 等. 稀有放线菌产生的抗生素[J]. *中国抗生素杂志*, 2008, 33(4): 193-197.
- [6] 李子强, 贾云宏, 杨殿深. 稀有放线菌产生抗菌药物的多样性[J]. *中国现代应用药学*, 2013, 30(12): 1373-1383.
- [7] LEONARD K, RICHARD H B. Natural product discovery: past, present, and future [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2016, 43(2): 155-176.
- [8] KARTHIKEYAN B, JALEEL C A, LAKSHMANAN G M, et al. Studies on rhizosphere microbial diversity of some commercially important medicinal plants [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2008, 62(1): 143-145.
- [9] CHAUHAN P S, CHAUDHRY V, MISHRA S, et al. Uncultured bacterial diversity in tropical maize (*Zea mays* L.) rhizosphere[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 51(1): 15-32.
- [10] 莎姆布鲁克 J. 分子克隆实验指南(上下册) [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 1564-1570.
- [11] 徐祯. 特异生境放线菌的选择分离及新种鉴定[D]. 厦门: 厦门大学, 2012: 18-19.
- [12] 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.
- [13] 徐丽华, 姜怡, 张华, 等. 微生物资源学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2000: 327.
- [14] WU Y, LU C, QIAN X, et al. Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants [J]. *Current Microbiology*, 2009, 59(4): 475-482.
- [15] KOICHIRO T, GLEN S, DANIEL P, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [16] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [17] SHIRLING E B, GOTTLIEB D. Methods for characterization of *Streptomyces* species [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966(16): 313-340.
- [18] 连莲香. 特殊生境真菌的分离、活性筛选和次级代谢产物研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2014: 29-30.
- [19] 弗雷谢尼 R I. 动物细胞培养基本技术指南[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 490-494.
- [20] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 30-60.
- [21] LI D, HUANG Y J, SONG S Y, et al. *Kibdelosporangium lantanae* sp. nov., isolated from the

<http://jxmu.xmu.edu.cn>

- rhizosphere soil of an ornamental plant, *Lantana camara* L. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(8): 2581-2585.
- [22] LI D, SONG J J, HUANG Y J, et al. *Kribbella mirabilis* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of a herbaceous plant, *Mirabilis jalapa* L. [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(9): 3143-3147.
- [23] PRANAMUDA H, TOKIWA Y. Degradation of poly (*L*-lactide) by strains belonging to genus *Amycolatopsis* [J]. Biotechnology Letters, 1999, 21(10): 901-905.
- [24] JARERAT A, TOKIWA Y. Degradation of poly (tetramethylene succinate) by thermophilic actinomycetes [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23(8): 647-651.
- [25] JARERAT A, TOKIWA Y. Poly (*L*-lactide) degradation by *Saccharothrix waywayandensis* [J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(5): 401-404.
- [26] SUKKHUM S, TOKUYAMA S, KITPRECHAVANICH V. Development of fermentation process for PLA-degrading enzyme production by a new thermophilic *Actinomyces* sp. T16-1 [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2009, 14(3): 302-306.

Biodiversity Analysis and Bioactivity Detection of Actinomycetes from Rhizosphere Soil in Xiamen and Nanjing Area, China

WANG Fei¹, LI Dan¹, HUANG Yaojian¹, DENG Xianming¹, WU Yingying^{2*}

(1. State-Province Joint Engineering Laboratory of Targeted Drugs from Natural Products, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. National Engineering Research Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201406, China)

Abstract: To investigate the diversity of actinomycetes from rhizosphere soil in different regions and to screen the strains with antibacterial and antitumor activities, the *16S rRNA* gene sequencing and phylogenetic analysis were used to explore the diversity of actinomycetes, which were isolated from 17 rhizosphere soil samples with two selective media. And then 6 bacteria, 2 fungi and 4 tumor cells were used as indicators to determine the biological activities of actinomycetes. In this study, a total of 178 actinomycetes were isolated from the rhizosphere soil, including 27 strains as rare actinomycetes, which accounted for a total of 15.2%. The rare actinomycetes can be assigned to 9 genera, which are *Microbacterium*, *Amycolatopsis*, *Kribbella*, *Nonomuraea*, *Micromonospora*, *Streptosporangium*, *Kibdelosporangium*, *Cellulosimicrobium*, *Isoptericola*, and 2 strains of them were novel species. Among the isolated actinomycetes, 82 strains (46.1%) had antibacterial activities against one or more indicators, 60 strains (33.7%) had inhibitory activities against one or more tumor cells. In conclusion, the results show that the rhizosphere soil is a highly diverse actinobacterial community, in which most of them appear to be novel candidate species. Therefore, the actinomycetes with biological activities could be a promising source for secondary metabolites separation and microbial pharmaceutical developments.

Key words: actinomycetes; selective isolation; biodiversity; bioactivity