

青海盐碱环境中具抗肿瘤活性放线菌的筛选和多样性研究

陈义光^{1,2}, 姜 怡¹, 李文均¹, 崔晓龙¹, 徐丽华^{1*}

(¹云南大学 云南省微生物研究所 云南省生物资源保护与利用重点实验室 昆明 650091)

(²吉首大学 生物资源与环境生态重点实验室 生态研究所 吉首 416000)

摘 要: 从我国青海省采集盐碱土样或泥样,用添加 1.0~3.0mol/L NaCl 的 GPY 琼脂培养基和 ISP 2 琼脂培养基分离到 145 株典型放线菌菌株。采用 6 种肿瘤细胞株对分离菌株的发酵产物进行体外筛选,得到 26 株抗肿瘤活性阳性菌株(17.9%),19 株为拟诺卡氏属(*Nocardiopsis*)菌株,7 株为链霉菌属(*Streptomyces*)菌株。在抗肿瘤活性、形态特征、生理生化特性和全细胞水解物氨基酸组分分析等实验结果的基础上,选取差异较大的 8 株抗肿瘤活性阳性菌株进行 16S rRNA 基因序列测定和系统发育多样性分析。结果表明 2 株属于链霉菌属(*Streptomyces*)的 1 个已知物种和 1 个潜在新种,6 株属于拟诺卡氏属(*Nocardiopsis*),可能代表该属的 4 个新种。研究表明青海盐碱环境中存在产生抗肿瘤活性物质的重要放线菌资源,也提示其中蕴藏着较丰富的微生物多样性。

关键词: 抗肿瘤活性;放线菌;拟诺卡氏菌;盐碱环境;微生物多样性;青海

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)05-0757-06

生长在盐湖、盐碱土壤等盐碱环境中的微生物,由于长期的进化选择,形成了独特的环境适应模式、特殊的生理机制和独特的基因类型,并有多重代谢产物和细胞物质可以利用,不仅成为了生命科学理论研究的理想材料,并且成为一类潜在的生物资源。因而,近年来引起各国研究者的广泛重视^[1-3]。我国青海省境内有大面积的盐湖和盐碱地,是研究盐碱环境微生物资源的理想场所。近年来,对青海省盐湖、盐碱土壤等盐碱环境中的原核微生物资源进行了一系列研究,从中发现了较多的微生物新类群,并筛选出了一批具有较强生物活性的菌株,为我国西北盐碱环境中微生物资源的利用与保护打下了基础^[4-18]。本文报道了对分离自青海盐碱环境的放线菌的抗肿瘤活性筛选结果,并分析了抗肿瘤阳性菌株的微生物多样性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: PCR 引物、PCR 常规操作试剂和酶均购自 TaKaRa 公司;PCR 仪为 PE-9600

型凝胶成像系统及成像软件 GeneSnap 3.0 购自 SynGene 公司。

1.1.2 菌株和细胞株: 实验菌株分离自青海盐碱土样和泥样,肿瘤细胞株由德国 Oncotest 公司提供。

1.1.3 培养基: GPY 琼脂培养基(Glucose-Peptone-Yeast extract agar)^[14]、ISP(International *Streptomyces* Project,ISP)系列琼脂培养基^[19]按文献配制。发酵培养基组成:葡萄糖 20g,甘露醇 20g,大豆粉 20g,蛋白胨 2g,NaCl 20g,CaCO₃ 3g,(NH₄)₂SO₄ 5g,MgSO₄·7H₂O 0.5g,KH₂PO₄ 0.2g,水 1000mL,pH 7.5。

1.2 样品采集和菌株分离

2002 年 8 月从青海省采集盐碱土壤样品或盐湖底泥样品,风干,120℃处理 1h,按常规方法制成稀释液。以 GPY 琼脂和 ISP 2 琼脂为基础培养基,配成含 NaCl 1.0、2.0 和 3.0mol/L,pH 值为 7.0、8.0、9.0 和 10.0(用饱和 Na₂CO₃ 调节)的系列分离培养基,倒平板,取 0.2mL 一定浓度的样品稀释液涂布平板,于 28℃培养 7~28d。挑取单菌落进行四分体划线纯化,所得纯培养物制成冻干牛奶管和斜面保存在 4℃备用。

基金项目:国家“973 项目”——重点基础研究发展计划(2004CB719601);国家自然科学基金(30460004,30660004,30600001,30560001);云南省自然科学基金项目(2004C0002Z,2004C0002Q,2006C0006M);云南省中青年学术带头人后备人才基金(2005PY01-1)

* 通讯作者。Tel:86-871-5035263;E-mail:mchenjsu@yahoo.com.cn,lijihu@ynu.edu.cn

作者简介:陈义光(1965-),男,湖南人,在职博士研究生,副教授,主要从事微生物资源与生态研究;E-mail:mchenjsu@yahoo.com.cn

其他作者:唐蜀昆¹,陈华红¹,张玉琴¹,刘祝祥²,姜成林¹,文孟良¹

收稿日期:2007-01-26;接受日期:2007-04-10;修回日期:2007-06-19

1.3 抗肿瘤活性测定

1.3.1 菌株发酵 :刮取一支成熟的斜面孢子 ,接种于装有 80mL 发酵培养基的 500mL 三角瓶中 , 200r/min 28℃培养 96h。

1.3.2 抗肿瘤活性测定 :发酵培养物加等体积乙醇于 150r/min 振荡 24h ,4000r/min 离心 ,上清液蒸干 ,甲醇溶解 ,冻干 ,得发酵液初提物 ,邮寄给协作单位德国 Oncotest 公司 ,用 6 种肿瘤细胞株进行体外抗肿瘤活性检测。

1.4 菌株的初步鉴定

形态观察、培养特征、生理生化特性、全细胞氨基酸分析按文献 [5, 12] 所用方法进行。除 NaCl 和酸碱耐受实验 ,其它实验所用培养基均补充 1mol/L NaCl ,用饱和 Na₂CO₃ 调节 pH 值到 7.5。

1.5 16S rRNA 基因序列测定和系统发育分析

总 DNA 提取、16S rRNA 基因的 PCR 扩增和序列测定按 Cui 等^[21]使用的方法进行。根据测序结果 ,用 Blast 搜索程序从 GenBank 中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列 ,用 CLUSTAL X 进行多重序列比对^[22] ,系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算^[23] ,用 MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)软件包采用邻接法 (Neighbor-Joining method)进行聚类分析和系统进化树构建^[24]。

2 结果和分析

2.1 菌株分离和抗肿瘤活性筛选

经纯化和初步去冗余后 ,共分离到 145 株典型放线菌菌株。用胃癌 (gastric cancer)GXF251L 和肺

癌 (lung cancer)LXFL529L 高耐药性肿瘤细胞株 ,乳腺癌 (mammary cancer)MAXF401NL 和皮肤癌 (melanoma cancer)MEXF462NL 中等耐药性肿瘤细胞株 ,肾癌 (renal cancer)RXF486L 和子宫癌 (uterus cancer)UXF1138L 敏感肿瘤细胞株共 6 个肿瘤细胞株对这些分离菌株的发酵液初提物进行体外抗肿瘤活性筛选 (发酵液初提物用量为 75μg/mL)。共有 26 株分离菌株具有一定程度的抗肿瘤活性 (阳性率 17.9%) ,其中除了 YIM 80056、YIM 80127、YIM 80139 对乳腺癌 (mammary cancer)MAXF401NL 无活性 ,YIM 80193 对肾癌 (renal cancer)RXF486L 无活性 ,YIM 80172 对胃癌 (gastric cancer)GXF251L 和肾癌 (renal cancer)RXF486L 无活性 ,YIM 80175 对胃癌 (gastric cancer)GXF251L 和肺癌 (lung cancer)LXFL529L 无活性 ,YIM 80188 对乳腺癌 (mammary cancer)MAXF401NL 和子宫癌 (uterus cancer)UXF1138L 无活性 ,其它菌株的发酵初提物对 6 种供试肿瘤细胞株均有不同程度的抗性。

2.2 抗肿瘤阳性菌株的初步鉴定

结合培养特征、显微特征和氨基酸组分分析结果 26 株抗肿瘤阳性菌株中 ,19 株为拟诺卡氏属 (Nocardopsis)菌株 ,7 株为链霉菌属 (Streptomyces)菌株。其中 5 株拟诺卡氏菌属菌株 YIM 80127、YIM 80133、YIM 80174、YIM 80186、YIM 90022 和 4 株链霉菌属菌株 YIM 80136、YIM 80138、YIM 80147、YIM GQ-14 的生物学特性和系统发育分析已有文献报道^[10-12] ,其它 17 株菌的部分表型特征见表 1。这 17 个菌株中 ,YIM 80038、YIM 80139 和 YIM 80201 属于链霉菌属 ,其余 14 株属于拟诺卡氏菌属。

表 1 17 株具抗肿瘤活性菌株的部分表型特征

Table 1 Some phenotypic characteristics of 17 antitumor-positive actinomycete strains

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Amino acid ⁺	m	m	m	L	m	m	m	L	m	m	m	m	m	L	m	m	m
pH (range)	6-11	6-11	7-11	6-11	7-11	7-11	7-11	7-11	7-11	7-11	7-11	7-11	7-11	6-9	7-11	7-11	7-11
pH (optimum)	8	7	8	9	8	8	9	8	8	8	8	8	7	7	8	8	8
[§] NaCl (range)	0-2.5	0-2.5	0-2.5	0-2.5	0-2.5	0-2.5	0-2.5	0-1.5	0-2.5	0-2.5	0-2.5	0-3.0	0-2.5	0-2.5	0-2.5	0-2.5	0-3.0
[§] NaCl (optimum)	1	1	0.5	1.5	1	1	1	0	0	0	1.0	1.5	0	0.5	1	0.5	1.0
Gelatin liquefaction	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+
Milk coagulation	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
Starch hydrolysis	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
Urease production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilization of :																	
L-Arabinose	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Cellobiose	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-

续表 1

D-Fructose	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Characteristics	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
D-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucose	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Mannitol	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Raffinose	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Rhamnose	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Ribose	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Sodium acetate	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Sodium citrate	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Alanine	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
L-Glycin	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
L-Histidine	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+

YIM strains :1 80031 ; 2 80033 ; 3 80034 ; 4 80038 ; 5 80056 ; 6 80127 ; 7 80131 ; 8 80139 ; 9 80170 ; 10 80172 ; 11 80175 ; 12 80188 ; 13 80193 ; 14 80201 ; 15 80218 ; 16 80225 ; 17 80290. + ,Positive ; - ,Negative. * m ,meso-DAP ; L ,L-DAP ; § NaCl : mol/L.

2.3 系统发育分析

在生物活性筛选的基础上 结合菌落形态、显微形态、生理生化特征和细胞壁氨基酸组成等结果 选择 8 株生物活性强、表型差异明显的菌株进行 16S rRNA 基因序列测定 ,序列保存在 GenBank 相应数据库中(序列号见图 1)。用 Blast 搜索软件从 GenBank 等数据库中进行相似性搜索 ,调出相似性最高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列 ,用相关软件进行序列比对、相似性计算、进化距离矩阵计算、聚类分析和系统进化树构建等系统发育分析(图 1)。按 16S rRNA 基因序列相似性大于 97 % 的菌株归于同一物

种计^[25] 8 个菌株可以归为 6 个物种 ,其中 6 株属于拟诺卡氏菌属(*Nocardiosis*)的 4 个物种(图 1-A) , 2 株属于链霉菌属 (*Streptomyces*)的 2 个物种 (图 1-B)。

在系统进化树上(图 1-A) ,菌株 YIM 80034、YIM 80193 分别与拟诺卡氏菌属(*Nocardiosis*)的 *N. exhalans* DSM 44407^T 和 *N. dassonvillei* subsp. *dassonvillei* DSM 43111^T 以 99.5% 和 99.3% 的 16S rRNA 基因序列相似性聚在一起。YIM 80031 与 *N. metallicus* DSM 44598^T 和 *N. prasina* DSM 43845^T 聚为一簇 ,它们之间的 16S rRNA 基因序列相似性为

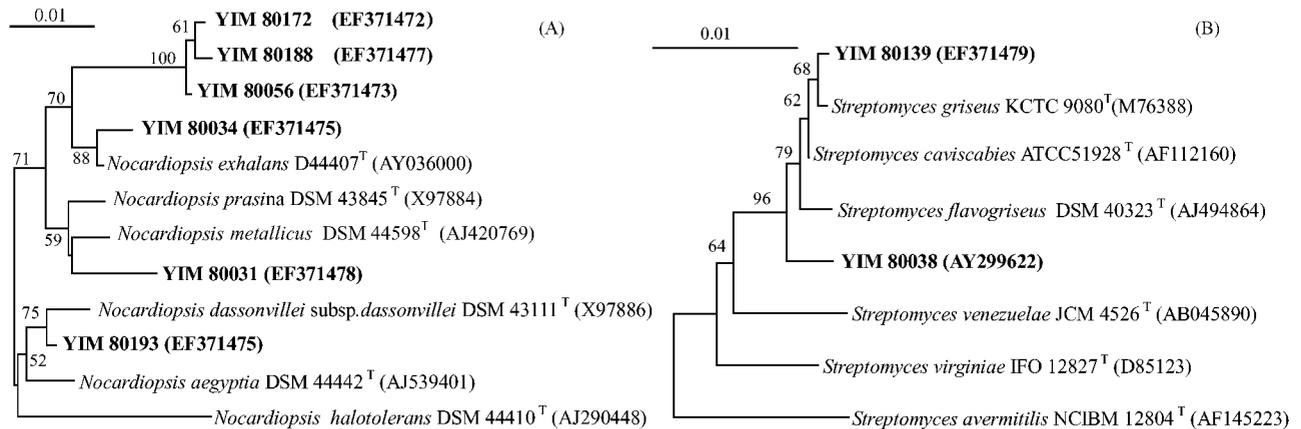


图 1 8 株抗肿瘤活性阳性菌株及其从 GenBank 等数据库中调集的相关属种构建的以 16S rRNA 基因序列为基础的系统进化树(A B)

Fig.1 Neighbor-Joining tree (A B) constructed showing the phylogenetic relationships among 16S rRNA gene sequences obtained from the 8 antitumor-positive actinomycete strains and their closely related sequences downloaded from GenBank etc. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values (> 50%) based on neighbour-joining analyses of 1 000 resampled data sets. Bar ,1 nucleotide substitutions per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.

98.4%。菌株 YIM 80056YIM、YIM 80172 和 YIM 80188 以极高的 16S rRNA 基因序列相似性(99.7%)聚为一簇,与这 3 个菌株系统发育关系最密切的是 *N. exhalans* DSM 44407^T,它们之间的 16S rRNA 基因序列相似性为 98.1%~97.8%。在拟诺卡氏属中,有效发表种之间系统发育关系很密切,有些有效发表种之间的 16S rRNA 基因序列相似性甚至高于 99.5%^[10,11]。Stackebrandt 和 Pukall 认为即便两菌株间的 16S rRNA 基因序列相似性大于 99.5% 也可能属于不同的物种^[26],但须经过 DNA 同源性分析。所以,菌株 YIM 80034、YIM 80193 和 YIM 80031 可能分别代表拟诺卡氏属的 3 个新种,而菌株 80056YIM、YIM 80172 和 YIM 80188 可能是拟诺卡氏属另一个新种的菌株。

在系统进化树上(图 1-B),菌株 YIM 80038 和 YIM 80139 以较高的 16S rRNA 基因序列相似性(99.3%~99.8%)与链霉菌属(*Streptomyces*)的 3 个有效发表种的典型菌株 *S. caviscabies* ATCC 51928^T、*S. griseus* KCTC 9080^T 和 *S. flavogriseus* DSM 40323^T 聚在一起,应属于链霉菌属。菌株 YIM 80038 与 *S. caviscabies* ATCC 51928^T 系统发育关系最为密切,它们之间的 16S rRNA 基因序列相似性为 99.4%。但该菌株在系统进化树上不与这 3 个菌株中的任何 1 个单独相聚,而是以较高的自展值(bootstrap value 96%)支持形成一个独立进化分支。所以,菌株 YIM 80038 可能代表链霉菌属的一个潜在新种^[26]。菌株 YIM 80139 与 *S. griseus* KCTC9080^T 系统发育关系最为密切,以 99.8% 的相似性在系统进化树上聚在一起,应该属于灰色链霉菌(*S. griseus*)的一个菌株。

当然,要最终确定以上菌株的分类地位,还需要结合形态特征、生理生化特征、细胞化学特征,以及与典型菌株基因组间的 DNA-DNA 同源性比较等多相分类(polyphasic taxonomy)研究结果。这些菌株的多相分类研究正在进行中。

3 讨论

随着研究的不断深入,大量微生物源生理活性物质被发现和应用,从普通环境中分离筛选新的活性物质产生菌的难度日益上升。由于极端环境的特殊生境使得其中的微生物具有丰富的物种多样性、基因多样性和代谢机制多样性,具有产生多样的生理活性物质的巨大潜力,因而向极端环境微生物寻

求药用物质和药物先导化合物成为各国的重要研究方向之一^[27]。海洋、盐湖、地下盐矿和盐碱地等高盐环境也是许多微生物演化的极端生境,其中蕴藏着极其丰富的微生物资源。从盐环境样品中分离筛选生理活性物质产生菌目前主要集中在海洋微生物资源的研究和开发方面^[28,29],而对盐湖、地下盐矿和盐碱地等内陆盐碱环境进行抗菌、抗肿瘤活性微生物分离筛选的研究只有零星报道。徐平等^[17,18]对分离自青海和新疆的放线菌进行了产生聚酮类天然产物分子筛选研究,结果表明有 24.1% 的供试菌株为阳性,其中多数为拟诺卡氏属(*Nocardiopsis*)等稀有放线菌菌株。叶央芳等^[30]对青海部分盐湖底泥样品进行了嗜盐微生物的分离,并对分离菌株的发酵产物进行了抗菌活性和抗肿瘤活性检测,发现在 45 株分离物中有 18 株显示不同程度的抗菌或抗肿瘤活性。本研究结果与以上结果类似,供试的 145 株分离自青海盐碱环境的放线菌菌株中,有 26 株具有抗肿瘤活性,阳性率 17.9%。这些研究结果充分表明我国青海、新疆盐碱环境中的微生物是产生天然生理活性物质的重要资源微生物。

基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析表明,8 个抗肿瘤活性阳性菌株代表了两个属的 6 个物种,其中可能有 5 个潜在新种。这一结果与其他研究者的结果一起揭示了青海盐环境中存在较为丰富的可培养微生物(culturable microorganism)多样性^[4-9,12-15,30]。最近 20 年来人们通过各种现代分子生物学手段认识到了自然界中还存在极大量的至今尚未能培养微生物(as-yet uncultured microorganism),柴丽红等^[16]分别用 DGGE 法和纯培养法对青海柯柯盐湖、茶卡盐湖底泥及周边土壤样品的细菌多样性进行了对比研究。通过纯培养方法分离到的 15 株细菌,分属于 6 个已知属和一个未知属,有可能鉴定出 6 个新种,可见其中可培养微生物多样性之高。DGGE 法的结果显示这些纯培养物的 DGGE 条带分布在一个很狭窄的范围内,仅占带谱总长度的 18%。结果充分说明了青海两个盐湖中存在大量的未培养细菌,分离到的纯培养仅占实有细菌的小部分。总之,青海盐碱环境中微生物资源极为丰富。深入研究分离培养条件和方法,设计新的分离程序,分离、培养和描述其中的新的、难以培养的微生物,并用多种模型筛选其产生的活性物质,是充分发掘和利用这些宝贵微生物资源的关键。

参 考 文 献

- [1] 刘志恒. 现代微生物学. 北京:科学出版社, 2002. 186-238.
- [2] 任培根,周培瑾. 中度嗜盐菌的研究进展. 微生物学报, 2003 **43**(3):427-431.
- [3] Antranikian G, Aguilar A. First meeting on Biotenchnology of Extremophiles. Hamburg: Technical University Hamburg-Harburg, 1993.
- [4] Cui XL, Schumann P, Stackebrandt E, et al. *Myceligenaras xiligouense* gen. nov. sp. nov. a novel hyphae-forming member of the family Promicromonosporaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004, **54**:1287-1293.
- [5] Li WJ, Zhang YG, Zhang YQ, et al. *Streptomyces sodiiphilus* sp. nov. a novel alkaliphilic actinomycete. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005 **55**:1329-1333.
- [6] Li WJ, Chen H H, Kim CJ, et al. *Microbacterium halotolerans* sp. nov. isolated from a saline soil in the west of China. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005 **55**:67-70.
- [7] Li WJ, Schumann P, Zhang YQ, et al. Proposal of *Yaniaceae* fam. nov. and *Yania flava* sp. nov. and emended description of the genus *Yania*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2005 **55**:1933-1938.
- [8] Schumann P, Cui XL, Stackebrandt E, et al. *Jonesia quinghaiensis* sp. nov. a new member of the suborder Micrococceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004 **54**:2181-2184.
- [9] Zhang YQ, Schumann P, Li WJ, et al. *Isoptericola halotolerans* sp. nov. a novel actinobacterium isolated from saline soil from Qinghai Province, north-west China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**:1867-1870.
- [10] 陈义光,李文均,崔晓龙,等. 具抗肿瘤活性放线菌菌株 YIM 90022 的分离和系统发育分析. 微生物学报, 2006 **46**(5):696-701.
- [11] 陈义光,姜怡,崔晓龙,等. 具抗肿瘤活性中度嗜盐菌 YIM 80186 的分离和系统发育分析. 云南大学学报(自然科学版) 2006 **28**(5):444-449.
- [12] 张永光,唐蜀昆,李文均,等. 嗜碱放线菌生理学特性的初步研究. 微生物学通报, 2004 **31**(1):30-35.
- [13] 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, 2006 **46**(2):191-195.
- [14] 徐平,李文均,高慧英,等. 聚酮类化合物生物合成途径基因阳性菌生物多样性研究. 微生物学报, 2005 **45**(6):821-821.
- [15] 李文均,唐蜀昆,王栋,等. 新疆青海中度嗜盐放线菌生物多样性初步研究. 微生物学报, 2004 **44**(1):1-7.
- [16] 柴丽红,崔晓龙,彭谦,等. 青海两盐湖细菌多样性研究. 微生物学报, 2004 **44**(3):271-275.
- [17] 徐平,李文均,高慧英,等. 产生芳香环聚酮类天然产物放线菌的分子筛选研究. 中国抗生素杂志, 2005 **30**(3):134-1381.
- [18] 徐平,李文均,张永光,等. 产生大环聚酮类天然产物放线菌的分子筛选研究. 中国抗生素杂志, 2003 **28**(6):321-325.
- [19] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966 **16**:313-340.
- [20] 胡昌勤,刘炜. 抗生素微生物检定法及其标准操作. 北京:气象出版社, 2004. 2-26.
- [21] Cui XL, Mao P, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov. a new member of the family Nocardiopsaceae. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001 **51**:357-363.
- [22] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997 **24**(4):876-488.
- [23] Kimura MA. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, 1980 **16**:111-120.
- [24] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987 **4**:406-425.
- [25] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 1994 **44**:846-849.
- [26] Stackebrandt E, Pukall R. Response to Althoff, et al. (Mar Biol 130:529-536)—Deriving taxonomic decisions from 16S rDNA: a case study. *Mar Biol*, 1999 **133**:159-161.
- [27] 刘全永,胡江春,薛德林,等. 海洋微生物生物活性物质研究. 应用生态学报, 2002 **13**(7):901-905.
- [28] Proksch P, Edrada RA, Ebel R. Drugs from the seas—current status and microbiological implications. *Appl Microbial Biotechnol*, 2002 **59**:125-134.
- [29] Carte BK. Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience*, 1996 **46**:271-229.
- [30] 叶央芳,严小军,黄晓春,等. 青海盐湖嗜盐微生物类群及 F16 菌株生长特性和抗菌、抗肿瘤活性. 应用生态学报, 2006 **17**(10):1771-1998.

Microbial diversity and screening of antitumor activity of actinomycete strains from saline and alkaline environments in the Qinghai Province, P. R. China

CHEN Yi-guang^{1,2}, JIANG Yi¹, LI Wen-jun¹, CUI Xiao-long¹, XU Li-hua^{1*}

(¹ Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

(² Key Laboratory of Bio-resources and Environmental Ecology, Institute of Ecology, Jishou University, Jishou 416000, China)

Abstract Soil and sediment samples were collected from saline and alkaline soils or lakes in the Qinghai Province, northwestern China. 145 actinomycete strains were isolated using Glucose-Peptone-Yeast extract agar (GPY) and ISP medium 2 agar supplemented with 1.0 ~ 3.0 mol/L NaCl at pH 7.5 ~ 10. The antitumor activities *in vitro* of the fermentation broth extracts from the 145 test strains were detected in 6 human tumor cell lines (gastric cancer GXF251L, lung cancer LXFL529L, mammary cancer MAXF401NL, melanoma cancer MEXF462NL, renal cancer RXF486L and uterus cancer UXF1138L). Out of 145 test strains 26 strains were positive in antitumor activities (17.9%) among them 19 strains belong to the genus *Nocardopsis*, 7 strains belong to the genus *Streptomyces*. Then 8 antitumor-positive strains were submitted for 16S rRNA gene amplification and phylogenetic analysis after a comparison of antitumor activities, morphological, physiological characteristics and whole cell amino acids analysis. The results suggested that strain YIM 80139 is a member of a known *Streptomyces* species *S. griseus*, while strain YIM 80038 may represent a potential new *Streptomyces* species and that the other 6 strains may represent 4 potential new species of the genus *Nocardopsis*. The results presented above showed that actinomycetes isolated from saline and alkaline samples are important resources for bioactive compounds, and the abundant microbial diversity in the saline and alkaline environments in the Qinghai Province, Northwestern China is attractive for further investigation.

Keywords: antitumor activity; actinomycete; *Nocardopsis*; saline and alkaline environment; microbial diversity; Qinghai Province

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719601); National Natural Science Foundation of China (NSFC) (30460004, 3066004, 30600001, 30560001); Yunnan Provincial Sciences and Technology Department (2004C0002Z, 2004C0002Q, 2006C0006M, 2005PY01-1)

* Corresponding author. Tel: 86-871-5035263; Fax: 86-871-5173878; E-mail: lihxu@ynu.edu.cn

Other authors: TANG Shu-kun¹, ZHANG Yu-qin¹, CHEN Hua-hong¹, LIU Zhu-xiang², JIANG Cheng-lin¹, WEN Meng-liang¹

Received: 26 January 2007/ Accepted: 10 April 2007/ Revised: 19 June 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>