

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学 号: 21620131152503

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

植物根际土壤中稀有放线菌的选择分离、鉴定及其生物活性研究

Selective Isolation, Identification and Biological Activity

Investigation of Rare Actinomycetes from Rhizosphere Soil

施 金 迪

指导教师姓名: 郑 忠 辉 教 授

吴 莹 莹 助 理 教 授

专 业 名 称 : 微 生 物 学

论文提交日期: 2 0 1 6 年 4 月

论文答辩时间: 2 0 1 6 年 5 月

学位授予日期: 2 0 1 6 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录	
摘 要.....	I
Abstract.....	III
1 前 言.....	1
1.1 放线菌的分类地位及研究进展	1
1.2 稀有放线菌资源的研究进展	3
1.2.1 稀有放线菌的研究进展及研究意义.....	3
1.2.2 拟无枝酸菌属的研究进展及研究意义.....	5
1.3 稀有放线菌选择性分离方法研究进展	7
1.3.1 样品来源的选择.....	7
1.3.2 样品预处理方法.....	9
1.3.3 分离培养基的选择.....	12
1.3.4 抑制剂的选择.....	13
1.3.5 分子探针技术.....	15
1.4 本课题研究的目的、意义及内容	16
2 材料与方法	18
2.1 材料	18
2.1.1 样品来源.....	18
2.1.2 实验菌种来源.....	20
2.1.3 常用培养基.....	20
2.1.4 常用试剂.....	22
2.1.5 主要仪器.....	24
2.2 方法	25
2.2.1 研究路线.....	25
2.2.2 拟无枝酸菌属特异性引物的设计以及阳性土样的筛选.....	25
2.2.3 放线菌的选择分离、纯化及保藏.....	29
2.2.4 放线菌排重.....	31
2.2.5 放线菌 16S rRNA 分子鉴定.....	31
2.2.6 生物活性测定.....	35
3 结果与分析	40

3.1 拟无枝酸菌属特异性引物的设计及验证	40
3.1.1 引物设计	40
3.1.2 引物的验证与筛选	40
3.2 筛选阳性土样	42
3.2.1 提取土壤样品总 DNA	42
3.2.2 土壤总 DNA 的 PCR	42
3.3 分离培养基的筛选	44
3.4 放线菌的分离与鉴定	46
3.4.1 聚乳酸 (PLA) 培养基选择分离效果	46
3.4.2 YZ 培养基选择分离效果	47
3.4.3 硫酸新霉素的使用效果	49
3.4.4 不同来源植物根际土壤的放线菌多样性	50
3.4.5 潜在新种的发掘	52
3.5 植物根际土壤放线菌生物活性	54
3.5.1 抗菌活性	54
3.5.2 抗肿瘤活性	61
4 讨论与结论	68
4.1 讨论	68
4.1.1 拟无枝酸菌属特异性引物的筛选效果分析	68
4.1.2 两种分离培养基对稀有放线菌选择性分离效果比较	69
4.1.3 硫酸新霉素的使用对稀有放线菌选择性分离效果分析	70
4.1.4 不同来源植物根际土壤中的放线菌多样性	70
4.1.5 放线菌的生物活性测定	71
4.1.6 不同发酵方式对粗提物活性的影响	72
4.2 结论与展望	73
参考文献	75
附 录	81
攻读硕士学位期间学术论文成果	110
致 谢	111

Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract.....	III
1 Preface.....	1
1.1 Advances in systematics of actinomycetes	1
1.2 Research status of rare actinomycetes	3
1.2.1 Progress and significance of the study on rare actinomycetes.....	3
1.2.2 Progress and significance of the study on Amycolatopsis.....	5
1.3 Advances in selective isolation of rare actinomycetes	7
1.3.1 The choice of sample sources	7
1.3.2 The choice of pretreatment methods.....	9
1.3.3 The choice of selective medium.....	12
1.3.4 The choice of antibiotics	13
1.3.5 Molecular probe techniques.....	15
1.4 Purpose, Contents and Significance of this thesis.....	16
2 Materials and Methods.....	18
2.1 Materials	18
2.1.1 Sources of the soil samples	18
2.1.2 Sources of experimental strains	20
2.1.3 Media for microorganisms	20
2.1.4 Reagents.....	22
2.1.5 Apparatus	24
2.2 Methods.....	25
2.2.1 Experimental scheme	25
2.2.2 Primer design of Amycolatopsis and Selection of soil samples	25
2.2.3 Selective isolation, purification and preservation of actinomycetes....	29
2.2.4 Repetitive strains elimination	31
2.2.5 16S rRNA gene identification.....	31
2.2.6 Bioactivities detection.....	35
3 Results and Analysis	40
3.1 Design and verification of primer for Amycolatopsis	40
3.1.1 Primer design	40
3.1.2 Selection and verification of primer	40

3.2 Selection of soil samples.....	42
3.2.1 Extract DNA of soil samples.....	42
3.2.2 PCR with DNA of soil samples	42
3.3 Selection of selective medium.....	44
3.4 Selective isolation and identification of actinomycetes.....	46
3.4.1 Selective isolation result of PLA medium	46
3.4.2 Selective isolation result of YZ medium.....	47
3.4.3 Selective isolation result of Neomycin Sulphate	49
3.4.4 Diversity of actinomycetes from different rhizosphere soil samples...	50
3.4.5 Potential new species	52
3.5 Bioactivities detection of the isolated actinomycetes	54
3.5.1 Detection of the antimicrobial activity	54
3.5.2 Detection of the antitumor activity	61
4 Discussion and Conclusion.....	68
4.1 Discussion.....	68
4.1.1 Selective efficiency of primer	68
4.1.2 Selective isolation efficiency of different media	69
4.1.3 Selective isolation efficiency of Neomycin Sulphate	70
4.1.4 Diversity of actinomycetes from different rhizosphere soil samples...	70
4.1.5 Bioactivities detection of actinomycetes	71
4.1.6 Influence of different fermentation modes on bioactivities	72
4.2 Conclusion and Prospect	73
References	75
Appendix.....	81
Publications	110
Acknowledgements	111

摘要

天然产物是新药制备的重要原料,绝大多数来源于微生物的天然产物都分离自放线菌,尤其是链霉菌。链霉菌是放线菌的重要组成成员,能合成结构类型丰富、生物活性多样的次级代谢产物,可用于创制抗生素、抗肿瘤药物、免疫抑制药物、抗虫药物等,在医疗、农业、食品等领域具有重要的应用价值。然而,随着对链霉菌持续的开发利用,目前从链霉菌中发现新型、高活性的次级代谢产物的几率在不断下降,来源于链霉菌的新药研发速度明显放缓。为了解决链霉菌活性次级代谢产物资源日趋枯竭的问题,人们将目光转向了与链霉菌一样能够产生丰富次生代谢产物的非链霉菌属的稀有放线菌资源。稀有放线菌广泛分布于植物根际中,植物根际的特殊微生态环境造就了根际稀有放线菌不仅数量多、种类多样性丰富,而且有可能形成了有别于非根际微生物的独特代谢途径。因此,根际稀有放线菌具有产生新型、高活性次级代谢产物的巨大潜力,是一类值得深入研究与开发的药用微生物资源。本论文对植物根际土壤中的放线菌进行分离、鉴定以及生物活性评价,旨在为植物根际放线菌,尤其是稀有放线菌的开发利用提供资源和科学依据。

本论文针对拟无枝酸菌属设计了特异性引物,并对采集自福建、浙江、广西、山东、云南这5省的45份植物根际土壤样品进行了快速筛选,获得了4份拟无枝酸菌属丰度较大的植物根际土壤样品用于后续分离。使用PLA培养基和YZ培养基,从上述4份阳性土壤样品中共分离得到301株放线菌,其中168株分离自PLA培养基,133株分离自YZ培养基;75株分离自1号土壤,59株分离自2号土壤,89株分离自38号土壤,78株分离自44号土壤。

根据菌株形态和抗菌活性结果,对排重后的166株菌进行16S rRNA分子鉴定。测序结果显示,有73株为稀有放线菌,占供测菌株的44.0%,其余为链霉菌属菌株。稀有放线菌归入17个属:野野村菌属(*Nonomuraea*)16株,放线马杜拉菌属(*Actinomadura*)13株,拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)11株,链孢子囊菌属(*Streptosporangium*)10株,壤霉菌属(*Agromyces*)5株;诺卡氏菌属

(*Nocardia*)4 株,微杆菌属(*Microbacterium*)3 株,拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)2 株,糖单胞菌属(*Saccharomonospora*)1 株,壤球菌属(*Agrococcus*)1 株,栖白蚁菌属(*Isoptericola*)1 株,小单孢菌属(*Micromonospora*)1 株,分枝菌属(*Mycobacterium*)1 株,珊瑚放线菌属(*Actinocorallia*)1 株,微球菌属(*Micrococcus*)1 株,小四孢菌属(*Microtetraspora*)1 株,红球菌属(*Rhodococcus*)1 株。

本论文还使用固体和液体两种发酵方式对 206 株放线菌进行了小量发酵,并测定其 412 份发酵粗提物的抗菌和抗肿瘤活性。采用滤纸片法,分别以金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、大肠杆菌、黑曲霉和白色假丝酵母作为指示菌进行抗菌活性测定。所测定的 206 株菌当中,有 157 株菌对一种或多种指示菌表现出抗菌活性,占供测菌株的 76.2%,其中有 54 株为稀有放线菌。采用 MTT 法,以人乳腺癌细胞 MCF-7、人骨肉瘤细胞 U2OS、人肝癌细胞 HepG2、人食管癌细胞 kyse-450、人早幼粒白血病细胞 HL-60、人套细胞淋巴瘤细胞 JEKO-1、人恶性黑色素瘤细胞 A375、人肺癌细胞 A549、人胃腺癌细胞 BGC823 这九种肿瘤细胞系为指示细胞株进行抗肿瘤活性测定,筛选到 113 株放线菌对一种或多种肿瘤细胞具有抑制作用,占供测菌株的 54.9%,其中有 37 株为稀有放线菌。

研究结果显示,植物根际土壤中链霉菌及稀有放线菌资源丰富,且菌株中有不少具有高抗菌和抗肿瘤活性,表明植物根际放线菌是一类极具潜在开发价值的药用微生物资源。

关键词: 稀有放线菌; 选择分离; 生物活性

Abstract

Natural products are very important source of medicine, most of natural antibiotics which isolated from microorganism are produced by actinomycetes, especially the streptomycetes. Streptomycetes is an important member of actinomycetes which can produce secondary metabolites with diverse biological activity and structure type. Those secondary metabolites have very important application value in medical, agriculture, food and other fields because they can be used for making antibiotics, antitumor drugs, immunosuppressive drugs, insect-resistant drugs, et. However, with the continuous development and utilization of streptomycetes, the probability of finding novel secondary metabolites from streptomycetes is falling, the speed of new drug research basis on streptomycetes is obviously slowdown. For solving this problem, scientists begin to concentrated on rare actinomycetes, which abundance in species and have the same ability of producing abundant secondary metabolites as streptomycetes. Rare actinomycetes are widely distributed in plant rhizosphere, the special micro ecological environment of plant rhizosphere has making the rhizosphere rare actinomycetes are plentiful in number and species diversity, and more likely form the unique metabolic pathways that different from others. Therefore, rhizosphere rare actinomycetes is a kind of valuable resources of medicinal microorganisms which has the huge potential of exploiting novel secondary metabolites with good bioactivities. The main work of this thesis is selective isolation, identification and biological activity investigation of rare actinomycetes from rhizosphere soil, and aim is to provide resources and scientific basis for exploiting and utilizing rhizosphere actinomycetes, especially rare actinomycetes.

In this study, a set of genus-specific oligonucleotide primers developed for the rapid identification of *Amiclatopsis* strains, was used to determine the presence, distribution of member of this genus in 45 rhizosphere soil samples taken from five province (FuJian, ZheJiang, GuangXi, ShanDong, YunNan). The most clear

genus-specific amplicons were detected from 4 rhizosphere soil samples. PLA medium and YZ medium were used for rare actinomycetes isolation. A total of 301 actinomycetes were isolated from the rhizosphere soil samples. Among these actinomycetes, 168 strains were isolated from PLA medium, the other 133 strains were isolated from YZ medium; and 75 strains were isolated from number 1 soil samples, 59 strains were isolated from number 2 soil samples, 89 strains were isolated from number 38 soil samples, 78 strains were isolated from number 44 soil samples.

The repetitive strains were excluded by comparison of the morphological characteristics and the antimicrobial activity. According to the 16S rRNA gene identification results of 166 stains, 73 strains (44.0%) were classified as rare actinomycetes, which belongs to 17 genus, including *Nonomuraea* (16 stains), *Actinomadura* (13 stains), *Nocardiopsis* (11 stains), *Streptosporangium* (10 stains), *Agromyces* (5 stains), *Nocardia* (4 stains), *Microbacterium* (3 stains), *Amycolatopsis* (2 stains), *Saccharomonospora* (1 stains), *Agrococcus* (1 stains), *Isoptericola* (1 stains), *Micromonospora* (1 stains), *Mycobacterium* (1 stains), *Actinocorallia* (1 stains), *Micrococcus* (1 stains), *Microtetraspora* (1 stains), *Rhodococcus* (1 stains).

206 stains were fermented by two method (solid/ liquid), bioactivities of the total 412 crude extract were detected in this study. The antimicrobial activity were detected by filtering paper method, using *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* and *Candida albicans* as indicators. There are 157 strains (76.2%) showed inhibitory effect on one or more indicator microorganisms, 54 of them are rare actinomycetes. While the antitumor activity were detected by MTT method with human breast cancer cells MCF-7, human osteosarcoma cancer cells U2OS, human liver cancer cells HepG2, human esophageal carcinoma cells kyse-450, human promyelocytic leukemia cells HL-60, human mantle cell lymphoma cells JEKO-1, human melanoma cells A375, human lung cancer cells A549, human gastric cancer cells BGC-823 as indicators. There are 113 strains (54.9%) showed inhibitory effect on one or more indicator cells, 37 of them are rare actinomycetes.

This thesis shows that streptomyces and rare actinomycetes resources in

Rhizosphere soil is very abundant, and many strains have good bioactivities. The results suggest that Rhizosphere actinomycetes is a kind of extremely potential exploitation resources of medicinal microorganisms.

Key words: rare actinomycetes; selective isolation; biological activity

厦门大学博硕士论文摘要库

1 前言

1.1 放线菌的分类地位及研究进展

放线菌（Actinomycetes）是一类单细胞微生物，因其菌落边缘菌丝常呈放射状而得名，革兰氏阳性，细胞壁主要由肽聚糖组成，没有真正的细胞核，属于原核生物，其细胞 DNA 中（G+C）含量为 55%~79%。放线菌大部分好气腐生，少数厌氧寄生，也有的放线菌与非豆科植物共生。放线菌具有多种细菌形态，如球状、杆状、分枝状和生长发育良好的菌丝体，有气生菌丝体和基内菌丝体之分以及各种形状的孢子体。放线菌在培养基中形成的菌落比较牢固，长出孢子后菌落呈现各种不同颜色的粉状表面，这与细菌不同；不能扩散性向外生长，这与霉菌也不同。

放线菌由 Gohn 于 1875 年发现^[1]，当时并未引起人们的足够的重视，直到 Waksman^[2]从分到的链霉菌中发现链霉素并因此获得诺贝尔奖后，放线菌才开始引起人们极大的关注。由于放线菌具有生长发育良好的菌丝体，19 世纪人们将它列入到真菌中，直到 20 世纪，随着人们对放线菌的深入了解，才将放线菌归入了细菌中。但放线菌在微生物中的地位，因分类学家的观点不同，其分类地位也经历了长久的摸索。1978 年，Gibbens 和 Murray^[3]根据细胞壁有无和性质将原核生物界分为 4 个门：薄壁菌门（Gracilicutes），包括革兰氏阴性细菌；厚壁菌门（Tenericutes），包括革兰氏阳性细菌和放线菌；疵壁菌门（Mendosicutes），包括无肽聚糖细胞壁的细菌；柔膜菌门（Mollicutes），包括无细胞壁的支原体类细菌。

1987 年，Woese^[4]发现了古细菌后，提出了生命三域学说：真细菌域（Eubacteria）、古细菌域（Archaeobacteria）及真核生物域（Eucaryota）。但当时这一学说未被国际接受和采纳，在《伯杰氏系统细菌学手册》（第一版）^[5]中，仍以表观特征将原核生物界分为 4 门个和 7 个纲。放线菌被归入原核生物界，厚壁菌门，分枝菌纲，放线菌目。

1990 年, Woese^[6]等经 rRNA、RNA 聚合酶分子结构特征和序列的深入研究后, 再次正式提出生命三域学说: 细菌域 (Bacteria)、古细菌域 (Archaea) 及真核生物域 (Eucarya)。自此 Woese 三域学说被国际普遍接受。

1997 年, Stackebrandt^[7]在历经多年对几百株放线菌与其相近的细菌的 16S 研究的基础上, 提出了新的分类系统, 建立了放线菌纲 (Actinobacteria)。当时放线菌纲分为 5 个亚纲、6 个目、10 个亚目。这个建议已被《伯杰氏系统细菌学手册》2001 年 (第二版) 采纳。由于放线菌纲是 DNA 高 (G+C) 含量的革兰氏阳性细菌,《伯杰氏系统细菌学手册》编委会决定, 放线菌最高分类单元才用域 (domain), 域下为门 (phylum), 即属于细菌域中第 14 门——放线菌门 (Actinobacteria)。由此, 放线菌最终被归入细菌域, 放线菌门、放线菌纲 (亚纲)、放线菌目 (亚目)。迄今, 放线菌门包括 23 个目, 53 个科, 约 230 个属^[8]。

众所周知, 放线菌对人类最重要的贡献是产生抗生素。根据 Lazzarini^[9]于 2001 年统计的数据 (图 1.1), 天然抗生素中有 45.6% 来源于链霉菌, 16.0% 来源于稀有放线菌, 21.5% 来自于真菌, 还有 16.9% 来自于其他细菌。可见, 放线菌来源的抗生素占比超过 50%, 而且其中不乏非常有效且已经用于临床的抗生素, 如链霉素、卡那霉素、红霉素、氯霉素、四环素、新生霉素、庆大霉素、马杜拉霉素等。除抗生素外, 放线菌还能够产生很多别的活性物质, 如氨基酸、维生素、有机酸、生物碱、酶及酶的抑制剂和免疫调节剂等^[10]。目前为止, 从细菌中发现的生物活性物质大约有 18000 种, 其中超过 10000 种是由放线菌中的链霉菌属所产生的^[11]。因此, 可以认为放线菌是最具经济价值和生物价值的微生物, 对推动医疗保健事业的发展做出了不可磨灭的贡献。

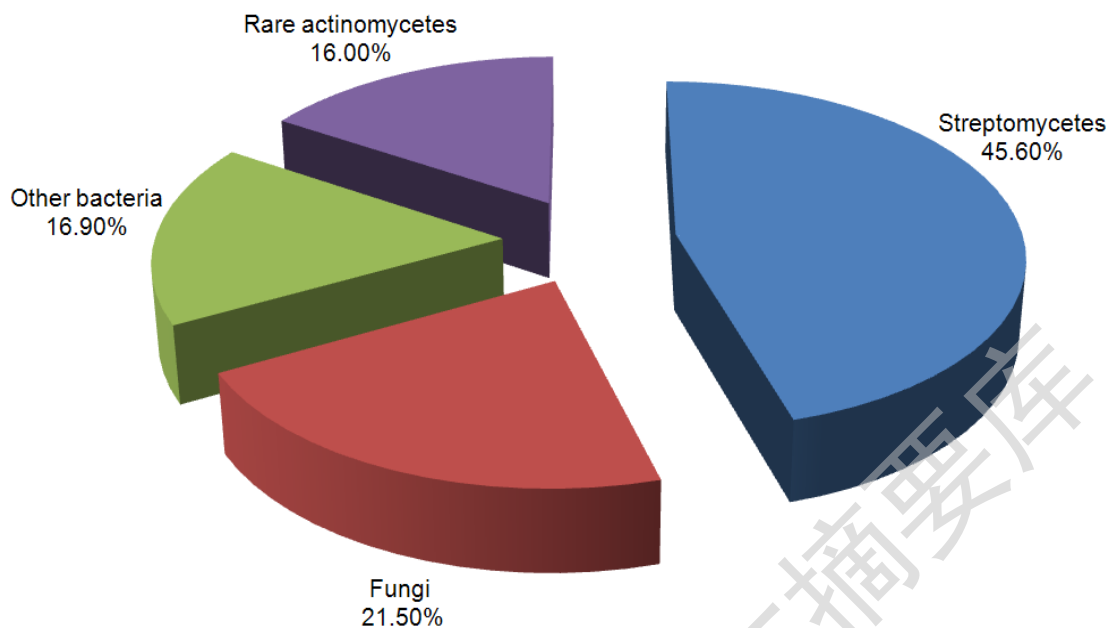
图 1.1 抗生素产生菌的分布^[9]

Fig. 1.1 Distribution of different groups of microorganisms producing antibiotics

1.2 稀有放线菌资源的研究进展

1.2.1 稀有放线菌的研究进展及研究意义

自发现链霉素以来，人们已从放线菌中分离得到了大量抗生素，其中 70% 以上由链霉菌产生^[12]。多年来，链霉菌已被世界各国反复筛选，再加上耐药菌的不断出现，从链霉菌中发现新的活性化合物的概率越来越小。人们为了扩大分离抗生素新的来源，就将目光渐渐转移到了链霉菌属之外的菌——“稀有放线菌”。稀有放线菌是指那些用传统方法分离时分离频度远远低于链霉菌的放线菌，通常按照常规方法分离得到的放线菌约有 95% 为链霉菌属，其他属的放线菌仅占 5% 左右^[13]。值得一提的是，稀有放线菌在环境中的数目并不一定比链霉菌少，只是用现有的实验技术和方法不易分离得到，所以到目前为止我们对稀有放线菌的研究远远不及链霉菌，这就使得稀有放线菌成为一个非常好的潜在的天然产物资源宝库。而且稀有放线菌种类繁多，代谢途径丰富多样，针对性的分离稀有放线菌，可以帮助我们更加高效的获得好的活性天然产物^[14]。

截至 2010 年，在科学家们的不懈努力下共发现了 220 个稀有放线菌属，其中有 50 种已经被报道能够产出近 2500 个具有生物活性的化合物。Subramani^[15]等总结了 1974 年至 2005 年链霉菌及稀有放线菌的抗生素生产的大概情况（表 1.1），可以发现，截至 1974 年，我们从链霉菌中分离得到了 1934 种抗生素，从稀有放线菌中得到了仅 125 种，到了 2005 年，从链霉菌中的发现的抗生素数目增长至 6550 种，而从稀有放线菌中发现的抗生素数目增长到了 2250，可以发现稀有放线菌的增长率更高。

表 1.1 链霉菌及稀有放线菌产抗生素的大约数目^[15]

Table 1.1 Approximate number of antibiotics produced by *Streptomyces* and rare *Actinomycetes*

Genus	1974	1980	1984	1988	2005
<i>Streptomyces</i>	1,934	2,784	3,477	4,876	6,550
Rare <i>Actinomycetes</i>	125	361	745	1,276	2,250

研究者陆续从稀有放线菌中发现了大量有价值的抗生素，如小单胞菌产生的庆大霉素^[16]、链孢子囊菌产生的氯霉素^[17]、马杜拉放线菌产生的马杜拉霉素和洋红霉素^[18,19]、糖多胞菌产生的红霉素^[20]、游动放线菌产生的替考拉宁^[21]等。另外，在稀有放线菌中，小单孢菌科、假诺卡氏菌科、高温单孢菌科、诺卡氏菌科、链孢囊菌科和类诺卡氏菌科这几个科的稀有放线菌中分离得到的抗生素数目所占比例较大，分别占 38.1%、15.0%、14.0%、11.0%、6.0%和 2.6%^[22]。其中很多抗生素已商业化，产生了巨大的社会和经济价值。

在微生物药物开发中，一条重要的策略是分离那些未被开发且同时又是次级代谢产物良好生产者的微生物群体^[23]。无论从何种角度来看，寻找新的稀有放线菌，都是符合策略的。由此可见，选择性的分离稀有放线菌，不仅可以减少对产生已知生物活性物质菌株的重复分离，还可以扩展放线菌次生代谢产物的化学多样性，另外对新药开发的意义也是非常的大。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.