

海南近海 30 株抗 B16 细胞活性放线菌的 16S rDNA 多样性分析

闫莉萍 洪葵* 胡申才 刘丽华

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所 热带作物生物技术国家重点实验室 海口 570110)

摘要:从海南近海,包括文昌红树林、海口红树林以及洋浦港等地采集样品,经苯酚、SDS、加热等预处理,稀释涂布麦芽汁-酵母膏琼脂(YE)、淀粉酪素琼脂(SC)、葡萄糖天冬氨酸琼脂(GA),或者直接将样品稀释涂布加有重铬酸钾的高氏一号琼脂(Gause)和麦芽汁-酵母膏琼脂等进行平板分离。共获得 354 株放线菌,其中有 76 株具有不同程度的抗 B16 细胞毒活性。比较发现加热预处理法和重铬酸钾选择培养法对于广泛分离筛选抗肿瘤活性放线菌不失为一种快速、简便、行之有效的方法。YE、Gause 培养基无论在分离到的放线菌总数,还是细胞毒活性菌株的比例上都显示了良好的效果。对 30 株具有较强抗 B16 细胞活性的链霉菌进行了扩增性 16S rDNA 限制性酶切片段多样性分析(16S ARDRA),表明这 30 株链霉菌之间有较大的基因差异性。050642、060386 和 060524 等 3 株菌序列分析进一步证明这 3 株菌属于链霉菌属,其中菌株 050642 与其亲缘关系最近的 *Streptomyces cattleya* 的相似性仅为 95%,因此可能是一个新种。

关键词:链霉菌,抗肿瘤活性,16S rDNA,16S ARDRA

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)02-0185-06

从放线菌筛选生物活性物质一直是微生物药物研究的热点,目前大约有 2/3 的天然抗生素是来自放线菌^[1]。放线菌在土壤中含量为最丰富,产活性物质的种类最多。随着筛选工作的广泛展开,重复筛选一直是一个令人棘手的问题,解决这一问题的途径之一是借助对生态环境的了解扩大放线菌筛选源。目前从海洋放线菌筛选到的活性物质还很少,其中的一个主要原因就是海洋样品中的放线菌相对于细菌而言,绝对数量要比等量的土壤样品少得多。我们从海南琼山、文昌红树林、洋浦、儋州近海港采集样品,运用加热、SDS、苯酚等多种预处理方法^[2~4],以及重铬酸钾选择培养法^[3],选用多种培养基对放线菌进行分离,并以肿瘤细胞 B16 作为靶标,筛选产抗肿瘤活性物质的放线菌。对 ID_{50} 大于 200 稀释倍数的 30 株链霉菌的 16S rDNA 进行了限制性内切酶多态性分析(RFLP),对其中 3 个菌株进行了 16S rDNA 全序列测定。

1 材料和方法

1.1 菌种分离筛选

1.1.1 样品:采自海南文昌、琼山红树林及儋州、洋浦、海口近海港的 25 个海泥、海参、海虾以及海草样品。

1.1.2 菌株的分离、发酵:参考文献[2~4]并有所改进。采用苯酚、SDS 两种方法对样品进行预处理,称取 2 g 样品(海生动植物体用无菌剪刀剪碎)到含有 1.5% 苯酚或 0.05% SDS 和 6% 酵母膏的 20mL 无菌海水中,30℃ 200r/min 下振荡 30min。然后稀释涂布麦芽汁-酵母膏琼脂(YE)^[5]、淀粉酪素琼脂(SC)^[2]、葡萄糖天冬氨酸琼脂(GA)^[2,4,5]。或者直接将样品稀释涂布加有重铬酸钾的高氏一号琼脂(Gause)^[3]和麦芽汁-酵母膏琼脂进行平板分离。28℃培养 1~3 周后挑菌接种到黄豆培养基(SLM)^[6]中 28℃ 200r/min 摇床发酵 4d。

1.1.3 抗肿瘤活性的测定:发酵液离心,经 0.22 μ m 孔径混合纤维树脂微孔滤膜过滤获得无细胞发酵上清。小鼠 B16 黑色素瘤细胞购自武汉大学典型培养物保藏中心,于 37℃ 5% CO₂ 下培养在含有 10% 小牛胎血清的 RPMI-1640 培养液中,约 3d 传代一次。将 98 μ L 浓度为 50000 个/mL 处于对数生长期的 B16 细胞加入 96 孔平底培养板,然后加入 2 μ L 过滤除菌后的发酵上清液,每个样品做 3 个重复,倍半稀释到 128 倍。通过 MTT 法^[7]进行抗肿瘤活性检测。活性指标以 ID_{50} 表示,即使 50% 的肿瘤细胞生长受到抑制的发酵上清液稀释倍数。

基金项目:863 海洋生物技术青年基金(2002AA628140) 海南省优秀中青年教师科研与教学奖励基金 海南省自然科学基金(30207)

* 通讯作者。Tel 86-898-66984969; Fax 86-898-66890978; E-mail hongkui@scuta.edu.cn

作者简介:闫莉萍(1977-),女,山西人,硕士研究生,研究方向为微生物应用技术。E-mail lpyan@126.com

收稿日期 2004-08-23, 修回日期 2004-11-24

1.1.4 活性菌株的初步鉴定 对有活性的菌株在高氏一号琼脂上进行插片培养,显微镜观察气生菌丝和基内菌丝,以及孢子丝形态,记录培养和形态特征,结合 16S rDNA 的 RFLP 分析,检索伯杰细菌鉴定手册,确定到属水平。

1.2 16S rDNA 的 ARDRA 分析

按文献[8]提取 DNA,用 primer^[9]:27f (5'-AGAGTTGATCC/ATGGCTCAG-3')和 1541R (5'-AAG-GAGGTGATCCAGCC-3')扩增 16S rDNA 基因。参照 TaKaRa LA TaqTM所推荐的条件进行扩增,反应体系(25 μ L):GCI buffer 12.5 μ L, LA Taq 酶 1.25U, dNTP (各 2.5mmol/L)4 μ L,正向引物(10 μ mol/L)2 μ L,反向引物(10 μ mol/L)2 μ L, DNA 模板(小于 1 μ g)1 μ L。经过试验发现运用以下的降落 PCR 条件可以扩增到特异性非常好的目的条带,95 $^{\circ}$ C 5min,之后进行 10 个循环(94 $^{\circ}$ C 1min,65 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 3min),然后再进行 20 个循环(94 $^{\circ}$ C 1min,58 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 3min);最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。将 16S rDNA 扩增产物纯化处理后,取 5~8 μ L 在 37 $^{\circ}$ C 下酶切 2h,酶切产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳后,将有带记为 1,无带记为 0,然后通过 MVSP 软件,采用 UPGMA 法进行聚类分析。

1.3 16S rDNA 全序列分析

将 16S rDNA 克隆到 pMD18-T 载体(购自 TaKaRa 公司),转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH 5 α ,由上海生物工程公司测序。将所测的 16S rDNA 序列与

GenBank 数据库中已有序列比较,并从数据库获得相关种和相关属的 16S rDNA 序列,用 ClustalX (Version 1.8)软件进行多序列比对以及系统发育树的构建,系统发育树的构建采用 Neighbor-Join 法。

2 结果

2.1 抗肿瘤活性菌株的分离筛选

从 25 个样品中成功地筛选到 375 株海洋放线菌,其中 76 株显示了不同程度的细胞毒活性,这些放线菌当中 90% 是来自红树林样品,这表明具有特殊生态系统的红树林是分离筛选具有生物活性海洋放线菌的良好资源。通过反复筛选,得到 30 株具有较强抗 B16 细胞活性的菌株。根据这 30 株菌的培养和个体形态特征,检索伯杰细菌鉴定手册初步确定它们都属于链霉菌属(表 1),关于菌种的详细鉴定正在进行中。为了尽可能多地筛选到海洋放线菌,我们运用了 SDS、苯酚样品预处理以及培养基添加重铬酸钾而不进行预处理等多种分离方法,选用了 SC、YE、Gause、GA 等多种培养基,发现不同的预处理和培养基筛选海洋放线菌的能力是不同的。从经培养基添加重铬酸钾而不进行预处理得到的放线菌总数和活性菌数都是最多,经加热预处理得到的放线菌总数和活性菌数次之(图略),从 SC 培养基分离到的放线菌总数最多,但由 YE 和 Gause 培养基分离到的活性菌比较多(图略)。

表 1 30 株有较强抗肿瘤活性菌株的培养特征

Table 1 Thirty strains possessing strong cytotoxic activities against B16 cell

Strains	Sampling site	Pretreat-ment	Medium	ID ₅₀	Culture characteristics
0401102	WC mangrove	phenol	YE	340	Aerial mycelia black, substrate mycelia yellow, spore chain long spiral
0401103	WC mangrove	phenol	YE	260	Aerial mycelia gray, substrate mycelia white, spore chain long spiral
050642	YP Harbor	phenol	GA	1270	Aerial mycelia deep gray green, substrate mycelia deep brown, soluble pigment light brown, spore chain long spiral
050643	YP Harbor	phenol	GA	420	Aerial mycelia light gray, substrate mycelia yellow, spore chain long spiral
050950	YP Harbor	none	YE*	630	Aerial mycelia purple, substrate mycelia white, spore chain long spiral
060386	HK mangrove	heating	Gause	1210	Aerial mycelia light gray, substrate mycelia yellow, spore chain close spiral
060519	HK mangrove	heating	Gause	470	Aerial mycelia gray, substrate mycelia orange, spore chain long spiral
060524	HK mangrove	heating	Gause	1300	Aerial mycelia light rose, substrate mycelia yellow, spore chain straight
061323	WC mangrove	heating	SC	540	Aerial mycelia gray, substrate mycelia pink, spore chain straight
061324	WC mangrove	heating	SC	470	Aerial mycelia white, substrate mycelia yellow, spore chain straight
061333	WC mangrove	heating	Gause	380	Aerial mycelia gray, substrate mycelia brown, spore chain straight
061336	WC mangrove	heating	Gause	250	Aerial mycelia gray, substrate mycelia yellow, spore chain long spiral
061337	WC mangrove	heating	Gause	490	Aerial mycelia gray, substrate mycelia brown, spore chain straight
061341	WC mangrove	heating	Gause	280	Aerial mycelia gray, substrate mycelia gray, spore chain straight
061342	WC mangrove	heating	Gause	340	Aerial mycelia gray, substrate mycelia brown, soluble pigment brown, spore chain long spiral

(表 1)

061347	WC mangrove	heating	Gause	570	Aerial mycelia gray , substrate mycelia light rose ,soluble pigment purple , spore chain long spiral
0614149	WC mangrove	heating	YE*	480	Aerial mycelia gray , substrate mycelia yellow , spore chain close spiral
0616104	WC mangrove	SDS	SC	300	Aerial mycelia gray , substrate mycelia yellow , spore chain long spiral
0616128	WC mangrove	SDS	YE*	840	Aerial mycelia gray , substrate mycelia light brown , spore chain spiral
0616153	WC mangrove	none	YE*	440	Aerial mycelia gray , substrate mycelia gray , spore chain straight
0616167	WC mangrove	none	YE*	880	Aerial mycelia gray , substrate mycelia gray , spore chain straight
0616169	WC mangrove	none	SC	320	Aerial mycelia gray , substrate mycelia brown , spore chain long spiral
0616203	WC mangrove	SDS	YE	570	Aerial mycelia gray , substrate mycelia brown , spore chain long spiral
0616206	WC mangrove	SDS	YE	430	Aerial mycelia gray , substrate mycelia gray , spore chain straight
0616208	WC mangrove	SDS	YE	280	Aerial mycelia gray , substrate mycelia gray , spore chain long spiral
0616210	WC mangrove	SDS	SC	480	Aerial mycelia gray , substrate mycelia gray , spore chain straight
0616233	WC mangrove	SDS	YE	220	Aerial mycelia gray , substrate mycelia brown , spore chain straight
0616261	WC mangrove	none	YE*	640	Aerial mycelia gray , substrate mycelia gray , spore chain long spiral
0617154	WC mangrove	none	YE*	420	Aerial mycelia gray , substrate mycelia gray , spore chain long spiral
0617230	WC mangrove	heating	Gause	540	Aerial mycelia orange , substrate mycelia orange , spore chain long spiral

Medium with “*” were added potassium dichromate ; YE :Yeast extract-Malt extract ; GA :Glucose-Asprine ; SC :Starch-Casin ; Gause :Starch-KNO₃ ;WC :Wenchang ; HK :Haikou ; YP :Yangpu ;ID₅₀ :Dilution degree of non-cell fermentation supernatant inhibited the growth of 50% of B16 cell.

用 *Afa* I、*Hae* III、*Msp* I 和 *Hha* I 4 种限制性内切酶将 16S rDNA 扩增产物酶切(图 1 示意),酶切图谱中,有带记为“1”,无带记为“0”转换为数值后,进行聚类分析(图 2)。从聚类分析结果看,这 30 株菌中有 17 种不同的 16S rDNA-RFLP 类型,在 72.1% 的相似性水平上聚为两个类群,26 株菌聚在类群 I,0616104、061342、061333 和 061337 等 4 株菌聚在类群 II。0616233、0616208 等 17 株菌在 91.8% 的相似性水平上聚为一个亚群,其中,有 16 株菌来自文

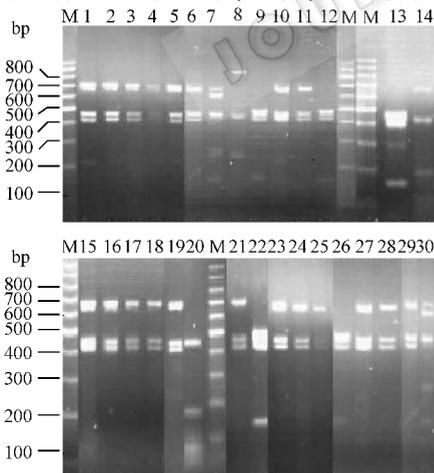


图 1 30 株抗肿瘤活性链霉菌 16S rDNA 扩增产物的 *Hha* I 酶切图谱

Fig.1 *Hha* I restriction patterns of amplified 16S rDNA of 30 *Streptomyces* possessing antitumor activity

Electrophoresis with 2% agarose gel at 67V for 2h. M :100 bp DNA Ladder Marker ; 1 ~ 30 :0616233, 061323, 061324, 0616128, 0616208, 0616206, 0616104, 061333, 050950, 0616153, 0616261, 060524, 050643, 061336, 0616167, 061347, 0617154, 0616203, 060519, 0401102, 0616210, 060386, 061342, 0616169, 0401103, 061337, 050642, 17230, 061341, 0614149.

昌红树林 3 个不同采样点的海泥样品 0613、0616、0617,在这个类群中有 5 种 16S rDNA-RFLP 类型,其中 061323、061324、0616128、0616261、0616167、061347、0617154、0616203、0616210、0617230、061341 11 株菌的 4 种酶切图谱完全相同,值得注意的是,来自文昌红树林 3 个海泥样品中的大部分菌株有极高的相似性,而来自树根样品的 0614149 却与它们有极大的差异。

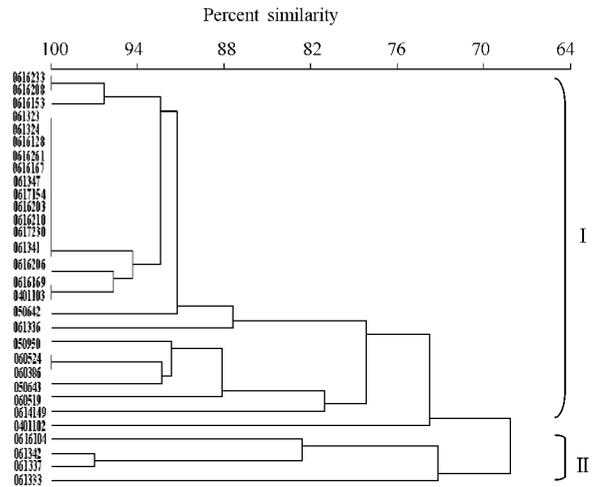


图 2 30 株抗肿瘤活性放线菌 *Hha* I、*Hae* III、*Msp* I、*Afa* I 酶切图谱的聚类分析

Fig.2 UPGMA cluster analysis of combined *Hha* I、*Hae* III、*Msp* I、*Afa* I restriction patterns of amplified 16S rDNA of 30 *Streptomyces* possessing antitumor activity

2.2 050642、060386 和 060524 等 3 株菌 16S rDNA 序列测定和系统发育分析

对菌株 050642、060386、060524 的 16S rDNA 序列分别进行了测定,与 GenBank 数据库序列比较,结

果表明:菌株 050642 与 *Streptomyces cattleya* 的相似性最高,达 95%;菌株 060386 与 *Streptomyces albogriseolus*、*Streptomyces pseudogriseolus* 等多株菌的相似性高达 99%。菌株 060524 与 *Streptomyces someliensis* 的相似性达 99%。3 株菌中,菌株 060386 和菌株 060524 的遗传距离较近,在系统发育树中处于同一个分枝,而菌株 050642 处于另外一个分枝(图 3)。

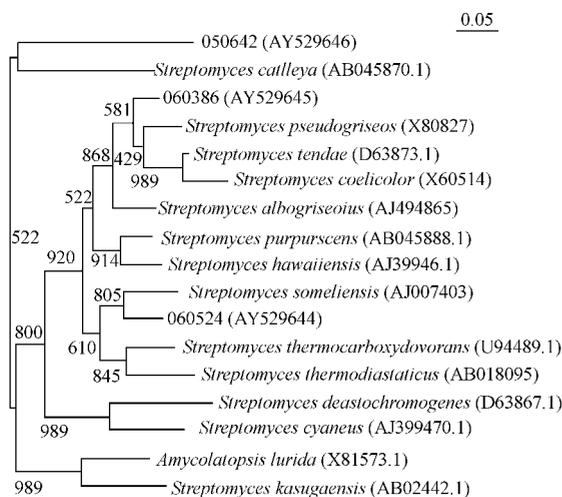


图 3 依据 16S rDNA 序列构建的菌株 050642、060386、060524 以及相关种、属的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic based on 16S rDNA sequence showing the positions of strains 050642, 060386, 060524 (GenBank accession numbers are AY529644, AY529645 and AY529646, respectively) and related taxa. The tree was constructed from a distance matrix by the NJ method. The analysis used 1425 aligned positions. Bootstrap values, expressed as percentage of 1000 replications, are shown at the branch points. The scale bar indicates 0.005 substitutions per nucleotide position.

3 讨论

我们对来自海南琼山、文昌红树林、洋浦、儋州近海港的样品进行抗肿瘤活性放线菌的分离筛选,对所用到的分离方法及培养基进行比较,结果证明不同的预处理有效与否与样品有关,来自文昌红树林及洋浦港的 01 和 06 样品,苯酚预处理后可较为成功地筛选到放线菌,而对于第六批的 03、05、13、14、16 和 17 等 7 个样品,用苯酚预处理后仅从样品 16 中筛选到一株未表现出任何生物活性的放线菌,而运用 SDS、加热以及添加重铬酸钾选择筛选法,可以大量筛选到海洋放线菌。这表明加热预处理法和重铬酸钾选择培养法对于广泛分离筛选抗肿瘤活性放线菌不失为一种快速、简便、行之有效的方法。YE、Cause 培养基无论在分离到的放线菌总数,还是抗肿瘤活性菌株的比例上都显示了良好的效果。

PCR 和限制性酶切分析相结合而产生的扩增性 16S rDNA 限制性酶切片分析(16S ARDRA)是一种快速而有效的种、属水平的遗传多样性分析方法。为了解采用实验室常规方法从红树林及近海所能分离筛选到的抗肿瘤活性海洋放线菌的多样性,我们对 ID_{50} 大于 200 稀释倍数的 30 株链霉菌进行了 16S ARDRA。近来一项研究表明^[13],对 100 个以上样品进行 16S ARDRA 时,所用的酶必须在 3 种以上,本研究中所用到的 4 种酶来自文献^[10,11]。由于放线菌基因 GC 含量较高,因此所选择的 4 种酶的识别位点都有 G 或者 C 碱基,其中 *Afa* I、*Hae* III 所得的谱型最为单调,仅有 3 种类型,*Hae* III 最大条带为 300bp,各条带间相差仅为 20bp 左右,故图谱不是很明了。而另外两种酶 *Msp* I 和 *Hha* I 的特异性较好,所得的谱型较为多样(图 1),都为 5 种以上,且条带间大多相差 50 bp 以上,谱型清晰明了,因此能更好地反映出 16S rDNA 的差异性。050642、060386、060524 等 3 株菌通过 16S rDNA 序列得到的系统发育关系与 16S ARDRA 得到的聚类分析结果基本吻合。这也证明了 16S ARDRA 的可靠性,但对于种间较小差异不够灵敏,如菌株 060386 和 060524 虽然 16S rDNA 序列分析表明它们的差异达到 3%,是不同种的差异,但它们具有相同 16S rDNA-RFLP 型。也有文献报道 16S ARDRA 一般运用于属、种水平的分析,对于种内菌株间 3% 的差异是不够灵敏的^[14,15],有研究将 16S ARDRA 与 rep-PCR 相结合来分析菌株间差异,得到良好的结果^[12]。因此可以推测到这 30 株链霉菌有更大的基因多样性。

从 060524、060386、050642 等 3 株高活性菌株 ($ID_{50} \geq 1200$) 16S rDNA 序列(GenBank 登记号分别为 AY529644, AY529645, AY529646)分析来看,菌株 060524、060386 与已知链霉菌的相关种相似性达 99%,故二者均属于链霉菌属。菌株 050642 与链霉菌 *Streptomyces cattleya* 的最高相似达 95%。因此菌株 050642 与 *Streptomyces cattleya* 可能不是同一个种。关于这 3 株菌的分类地位有待进一步的表现与基因的分类鉴定后确定。

近海岸尤其是红树林是一个受陆地冲积物严重影响的环境^[7],从近海岸分离到的放线菌多为链霉菌属,虽然这些链霉菌属表现了极强的耐盐度,在海水培养基中可以更好地生长,但很有可能是来源于陆地放线菌。本研究还在序列分析比对中发与 050642、060386、060524 等 3 株高活性菌株最相近的菌大多数生长的耐盐度在 10% 以上^[17],这进一步证

实了上述推测,可能正是由于这些链霉菌的孢子具有耐盐性,才可以适应海洋这个新环境,从而得以生存下来。也有许多研究,如对 Chesapeake Bay^[2]的放线菌多样性研究表明,所分离到的放线菌中游动放线菌占多数;Moran 等^[18]通过 16S rRNA 探针也检测到海洋沉积物中存在自身的链霉菌群;Jensen 和 Fennical^[20]报道来自海洋中的 82% 的革兰氏阳性菌只有在添加海水的培养基中才可以生长。

本研究还发现,放线菌的类群与样品来源之间有极大的特异性,酶切图谱相同的菌株均来自同一地点的样品,例如,分离自文昌红树林的 0616169 与 0401103 来自同一地点。虽然采样时间相隔了半年,但却有着相同的 16S rDNA-RFLP 型。对于同一样品,采用不同分离方法或不同培养基得到的活性放线菌大多相似性很高,例如,来自文昌红树林的多数菌株聚在 91.8% 以上的相似性水平(图 2)因此这几种可以成功分离筛选到具有抗肿瘤活性放线菌的分离方法和培养基对放线菌类群的选择特异性较小。有趣的是,挑取自同一平板,培养特征以及个体形态都十分相似的菌株间存在着较大的基因差异性,例如来自同一平板的菌株 050642 和 050643、菌株 0616206 和 0616208 无论基因型还是生物活性上都有较大差异。我们在挑取平板菌落时,往往认为相同培养特征可能是同一菌株,事实证明这种想法是一个极大的错误,它势必会造成一些有生物活性菌株的漏筛,因为菌株的生物活性是菌株特异的而非菌属特异^[2]。在挑取菌落时,不能单从培养特征来判断菌落是否相同,从而进行取舍。近年来发展起来的 PMS^[2](Pyrolysis Mass Spectrometry)法可以在平板上直接识别靶放线菌,并可已知链霉菌分成不同的基因种,此技术在筛选前期被用来区分相同的菌株,此分析方法所需生物材料少,快速、简便,是核酸指纹图谱无法比拟的。

致谢 本文蒙中国科学院微生物研究所东秀珠研究员审阅并提出宝贵意见,对放线菌的形态描述得到阮继生研究员的指导,在此表示感谢!

参 考 文 献

- [1] Bull A T. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu Rev Microbiol*, 1992, **46**: 219 - 252.
- [2] Takizawa M, Colwell R, Hill R T. Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(4): 997 - 1002.
- [3] 姜成林,徐丽华. 微生物资源学. 第二版,科学出版社, 1997, 16 - 21.
- [4] Pisano M A, Sommer M J, Lopez M M. Application of pretreatment for the isolation of bioactive actinomycetes from Marine Sediments. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, **25**: 285 - 288.
- [5] Okazaki T, Okami Y. Studies on marine microorganisms II actinomycetes in Sagami Bay and their antibiotic substances. *J Antibiotics*, 1972, **XXV**(8): 461 - 466.
- [6] Jensen P R, Dwight R, Fenical W. Distribution of actinomycetes in near-shore Tropical Marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**(4): 1102 - 1108.
- [7] Campling B B G, Baker H M, Cole S P C. Chemosensitivity testing of small cell lung cancer using the MTT assay. *Br J Cancer*, 1991, **63**(1): 75 - 83.
- [8] Heath L S, Sloan G L, Heath H E. A simple and generally applicable procedure for releasing DNA from bacterial cells. *Appl Environ Microbiol*, 1986, **51**: 1138 - 1140.
- [9] Dong X, Xin Y, Jian W, et al. *Bifidobacterium Thermacidophilum* sp. nov., isolated from an anaerobic digester. *Int J Syst Evolution Microbiol*, 2000, **50**: 119 - 125.
- [10] 彭桂香,陈文新. 16S rDNA-RFLP 分析新疆快生大豆根瘤菌的分类地位. 微生物学通报, 2000, **27**(4): 237 - 241.
- [11] Vinuesa P, Rademaker J L W, Bruijning F J, et al. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(6): 2096 - 2104.
- [12] Masters C I, Murry R G E, Moseley B E B, et al. DNA polymorphisms in new isolates of *Deinococcus radiopugnans*. *J Gen Microbiol*, 1991, **137**: 1459 - 1469.
- [13] Moyer C L, Tiedje J M, Dobbs F C, et al. A computer simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 2501 - 2507.
- [14] 王意敏,刘志恒. 放线菌的多相分类. 微生物学通报, 1999, **26**(2): 137 - 140.
- [15] 东秀株,洪俊华. 原核生物的多样性. 生物多样性, 2001, **9**(1): 18 - 24.
- [16] Stackebrandt E, Goebel M. Taxonomic note: a place for DNA - DNA reassociation and 16S RNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Bacteriol*, 1994, **44**: 846 - 849.
- [17] Pisano M A, Sommer M J, Brett B P. Hudson River Sediments as a source of actinomycetes exhibiting antifungal activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, **27**: 214 - 217.
- [18] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1974.
- [19] Moran M A, Rutherford L T, Hodson R E. Evidence for indigenous streptomycetes populations in a Marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 3695 - 3700.
- [20] Jensen P R, Fenical W. The relative abundance and seawater requirements of Gram-positive bacteria in near-shore Tropical Marine samples. *Microb Ecol*, 1995, **29**: 249 - 257.

16S rDNA diversity analysis of 30 *Streptomyces* isolates displaying significant cytotoxic activity against B16 cell from near-shore sediments of Hainan Island

YAN Li-ping HONG Kui* HU Shen-cai LIU Li-hua

(State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology , Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology , Chinese Academy for Tropical Agriculture Sciences , Haikou 571101 ,China)

Abstract : A total of 354 isolates of actinomycetes ,of which 76 were detected cytotoxic activity was isolated from near-shore marine samples collected at Wenchang mangrove , DanZhou harbor and YanPu harbor . Four isolation methods were employed , which are SDS pretreatment , phenol pretreatment , heating pretreatment and potassium dichromate selection culture , and media such as Yeast extract-Malt extract (YE) ,Glucose-Asprine(GA) ,Starch-Casin(SC) ,Starch-KNO₃ (Gause) were used . It was showed that heating pretreatment and potassium dichromate selection culture were more considerable methods for extensive isolation of actinomycetes . Medium YE and Gause showed best results in both the total number of actinomycetes and the number of active isolates against tumor cell B16 . The genotypic diversity of 30 strains of *Streptomyces* possessing strong cytotoxic activity against B16 cell ($ID_{50} \geq 200$) was analyzed by 16S ARDRA , which resulted in 17 RFLP types , and indicated relatively rich genotypic diversity among these *Streptomyces* . 16S rDNA sequence analysis of three strains , 050642 , 060386 and 060524 ($ID_{50} \geq 1200$) further confirmed that they all belong to *Streptomyces* genus and strain 050642 was suggested a novel *Streptomyces* . *Spp* with the highest similarity of 95% to *Streptomyces cattleya* .

Key words : *Streptomyces* , Cytotoxic activity , 16S rDNA , 16S ARDRA

Foundation item :Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2002AA628140) ; Fund of Hainan Outstanding Middle and Young Aged University Teachers and Hainan Natural Science Foundation (30207)

* Corresponding author . Tel 86-898-66984969 ; Fax 86-898-66890978 ; E-mail hongkui@scuta.edu.cn

Received date 2004-08-23

生活垃圾综合处理原理与技术(专著)

郭长军 ,许传森 ,李泽泉 编著 2004 年 11 月黑龙江人民出版社出版

RSDNT-207-00678-3/X57 ; 字数 25 万字 ; 开本 : 大 32 开 ; 印数 3000 册 ; 定价 28.00 元

读者对象

大专院校相关专业师生、市容环境卫生管理部门、从事城市垃圾处理的相关单位 , 以及所有关心城市垃圾处理工作的社会各界读者。

内容简介

环境保护是我国的基本国策 , 而城市垃圾处理是城市环境保护的重要内容 , 也是衡量城市文明程度和城市管理水平的重要标志之一。近几年来 , 我国的大部分城市都正在积极的进行城市生活垃圾处理工程的探索和实践 , 但由于国内无系统的垃圾处理理论和少有成功的实例 , 而从国外引进的卫生填埋、堆肥、焚烧发电三大处理方式均不合中国国情。照搬国外垃圾处理方式建设的处理厂 , 败多成少 , 造成不小的浪费。至今 , 全国城市垃圾无公害化处理率尚不足 20% , 在全球重视环保的今天 , 城市垃圾处理工作任务十分迫切 , 任重而道远。

为探索适合中国城市生活垃圾处理的科学方案 , 在省市有关领导支持和参与下 , 黑龙江高维企业集团于今年 6 月召开了全国首次“城市生活垃圾处理方案研讨会” 。 来自中国科学院、清华大学、哈尔滨工业大学、国家发改委、机械部、中石化的专家进行了认真热烈的研讨 , 确定综合处理方式是适合中国国情的最佳方式 , 是与卫生填埋、堆肥、焚烧发电三大方式并列的第四种新方式。

本书将依据研讨会学术成果 , 系统论述生活垃圾综合处理方式的基本原理和使用技术 , 明确阐述其内涵和外延。全书共分七章 30 节。