

2 株红树林淤泥放线菌的鉴定及抗菌活性研究

陈森洲, 黄大林, 刘 菁, 袁桂峰, 钟毓娟

(桂林医学院 微生物学与免疫学教研室, 广西 桂林 541004)

【摘要】【目的】对分离自广西北海红树林海洋淤泥中的 2 株放线菌(BH200951、BH200954)进行鉴定,并对其抗菌活性进行分析。【方法】对 BH200951 与 BH200954 2 株典型放线菌的形态特征及生理生化特征进行了观测,并采用医学药敏试验方法对其抗菌活性进行了测定,最后提取 2 株菌株的总 DNA,用放线菌通用引物对其 16 S rDNA 进行 PCR 扩增,对获得的扩增结果进行 DNA 序列测定,采用邻接法构建其与其他典型菌株的系统发育树。【结果】在高氏 1 号培养基上,BH200951 和 BH200954 菌株生长良好,菌落分别呈灰白色和黄色,菌落皱褶,致密坚实;在光学显微镜下观察发现,2 株菌株气生菌丝发达,呈深灰色,成熟后生成孢子丝;能使明胶液化,淀粉、纤维素水解,牛奶凝固而不胨化;对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、普通变形杆菌均有较好的抑制作用。经测序后比对显示,2 株放线菌菌株均属于链霉菌属,其中 BH200951 鉴定为链霉菌属(*Streptomyces aurantiogriseus*) AY999773 的变种;BH200954 初步鉴定为链霉菌属的仙台链霉菌。【结论】对分离自广西北海红树林海洋淤泥放线菌 BH200951 和 BH200954 菌株进行了鉴定,其发酵产物具有明显的抗菌活性。

【关键词】 海洋淤泥;红树林;放线菌;16 S rDNA

【中图分类号】 Q939.13⁺2;S182

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)02-0157-05

Appraisal and antibiotic activity research on two mangrove forest silt ray fungi

CHEN Sen-zhou, HANG Da-lin, LIU-jing, YUAN Gui-feng, ZHONG Yu-juan

(Guilin Medical College Department of Microbiology and Immunology, Guilin, Guangxi 541004, China)

Abstract: 【Objective】Two actinomycetes (BH200951, BH200954) isolated from the marine mangrove mud Beihai were identified, and their antimicrobial activity was analyzed. 【Method】Typical morphological, physiological and biochemical characteristics of BH200951 and BH200954 actinomycetes were observed, and susceptibility testing was performed to determine their antibacterial activity. The final total DNA strains was extracted, with the released strain 16S rDNA amplified, and the PCR amplification results was sequenced, the phylogenetic tree was constructed using the neighboring method. 【Result】Gao 1 medium, BH200951 and BH200954 strains grew well, colony color was gray and yellow, respectively, wrinkled colonies, dense solid; optical microscope showed that two strains of aerial hyphae developed, dark gray, mature growth of Sporothrix; gelatin liquefaction could be made, starch cellulose hydrolysed, milk solidified, but not frozen; against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* had good inhibition. Two actinomycete strains were sequenced and compared to be genus *Streptomyces*, of which BH200951 was identified as *Streptomyces* (*Streptomyces aurantiogriseus*) AY999773 variants; BH200954 identified as *Streptomyces* genus *Streptomyces Sendai*. 【Conclusion】Isolated from marine mud in Beihai, Guangxi Mangrove actinomycetes strains BH200951 and BH200954 were identified, and its fer-

* [收稿日期] 2010-07-22

[基金项目] 广西科学基金项目(0899006); 广西教育厅科研项目(200626)

[作者简介] 陈森洲(1951—)女, 湖南祁阳人, 教授, 硕士生导师, 主要从事放线菌资源研究与免疫学基因应用基础研究。

E-mail: senzhou@163.com

mentation products showed significant antibacterial activity.

Key words: marine mud; mangrove; actinomycetes; 16 S rDNA

许多医学上重要的抗生素,如氨基糖甙类、萜环类、氯霉素、 β -内酰胺类、大环内酯类和四环素等均由放线菌产生。市场上和临床实验应用的 800 个微生物源天然化合物中,其中来源于放线菌的抗生素占整个抗生素的 67%,主要是链霉菌(52%)和稀有放线菌(15%)^[1-2]。

红树林是分布于热带、亚热带海岸潮间带的木本植物群落,是热带海岸地带一种重要的湿地类型和重要的生态系统,该地带土壤由于处于咸淡水交汇的特殊环境,兼具海洋与陆质,同时又不断接受红树林植物的供养、庇护,蕴藏着极为丰富独特的微生物资源^[3]。从红树林淤泥中分离到的放线菌可产生多种重要的次生代谢物,具有抗菌、抗肿瘤等药用价值^[4]。广西沿海区域有许多红树林,面积为 8 374 hm²,占全国红树林面积的 38%,主要分布在广西的防城港、钦州和北海等地区^[5]。目前,关于广西红树林淤泥放线菌的研究,多集中于分离培养与鉴定方面^[6],而关于放线菌抗菌活性的报道还很少。为此,本研究对分离自广西北海海洋淤泥中的 2 株放线菌形态特征、生理生化特性及抗菌活性进行了分析,最后采用分子生物学方法对其进行了鉴定,旨在为寻找新的抗菌物质提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试放线菌 于 2008-04-11、2009-6-24 采集广西山口、大冠沙海湾红树林海洋淤泥标本,趁退潮至纵深约 1 km 处的潮间带,在沿海水横向约 1 km 范围内采集不同地点海水浸泡中的海洋淤泥,采集样品的深度为 15~20 cm,样品间相距至少 100 m,配制高氏 1 号培养基和 ISP2 培养基,经筛选获得 56 株放线菌,其中菌株 BH200951 和 BH200954 的分离及筛选参见文献^[7]。

1.1.2 培养基 (1)高氏 1 号培养基。高氏 1 号培养基组成为:20 g/L 可溶性淀粉,10 g/L KNO₃, 0.5 g/L NaCl,0.01 g/L FeSO₄,0.5 g/L MgSO₄, 20 g/L 琼脂,0.1 g/L 重铬酸钾,用过滤天然海水配制,pH 值为 7.2~7.4。

(2)ISP2 培养基。ISP2 培养基组成为:酵母膏 4.0 g,麦芽汁 10.0 g,葡萄糖 4.0 g,琼脂 20.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0。

(3)M-H 培养基。M-H 培养基组成为:牛肉浸液 600 mL,酪蛋白水解物 17.5 g,可溶性淀粉 1.5 g,琼脂 1.7 g,蒸馏水 400 mL。

1.1.3 主要仪器 主要仪器包括 Thermo Life Science PCR 仪,由美国热电公司生产;Philips XL-30 扫描电子显微镜,由荷兰飞利浦公司生产。

1.2 菌株的形态观察和培养特征

将 BH0951 和 BH0954 菌株用高氏 1 号培养基于 28 ℃埋片培养 7 d,取出埋片,用 Olympus BH-2 光学显微镜观察菌丝体形态,用扫描电子显微镜观察孢子丝及孢子形态,观察并记录培养菌落的特征。

1.3 菌株的抗菌活性^[8]

采用纸片琼脂扩散法进行预试验,选择 6 株标准菌株进行抗菌活性试验,这 6 株标准菌株分别为大肠埃希菌(*Escherichia coli*) ATCC25922、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC25923、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)和白假丝酵母菌(*Candida albicans*)。用 M-H 培养基培养菌株,采用医学药敏试验方法,分别测定 BH200951 和 BH200954 菌株摇瓶发酵液对以上 6 株标准菌株的抗菌活性,以 10 μ g/mL 链霉素作为对照,培养 16~18 h 后,测量抑菌圈的直径。

1.4 菌株的生理生化特征

供试菌株的生理生化特征采用文献^[9-11]的方法进行测定。

1.5 菌株的 16 S rDNA 序列测定及系统发育分析

基因组总 DNA 采用酶法提取^[7]。16 S rDNA 序列的 PCR 扩增使用放线菌通用引物:Primer A: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'; Primer B: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3',以上 2 个引物由上海生工公司合成。PCR 反应体系(总体积 50 μ L):10 $\times$ Buffer 5 μ L,dNTP (2.5 mmol/L) 4 μ L,Primer A (10 mmol/L) 2 μ L,Primer B (10 mmol/L) 2 μ L,Taq 酶(1U/ μ L)2 μ L,DNA 模板(50~100 ng) 2 μ L,双蒸水 33 μ L。PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min;95 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 3 min,共 30 个循环;72 ℃延伸 10 min。将 PCR 产物送上海生工公司测序。根据测序结果,先利用 Blast 软件对 GenBank、EMBL 等数据库中相似放

线菌的 16 S rDNA (16 S rRNA)序列进行搜索排序,然后采用邻接法(Neighbour-joining 法)进行系统发育树的构建及同源性比较。

2 结果与分析

2.1 2 株红树林淤泥放线菌的形态特征

在高氏 1 号培养基上,菌株 BH200951 和 BH200954 生长良好,大量基内菌丝伸入培养基内,

菌落表面干燥,粉绒状凸起,有皱褶,致密而坚实,其中 BH200951 菌落呈灰白色,BH200954 菌落呈黄色(图 1)。

在光学显微镜下对 2 株放线菌形态进行观察,可见气生菌丝发达,呈深灰色,成熟后生成孢子丝。在扫描电子显微镜下观察发现,2 株放线菌菌株的孢子丝呈紧密螺旋状,孢子丝可分化出孢子,孢子圆形或卵圆形,表面光滑(图 2)。

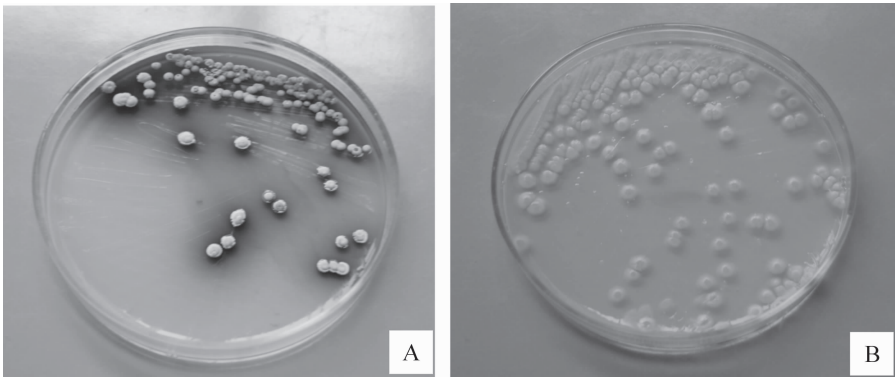


图 1 2 株红树林淤泥放线菌的菌落形态观察
A. BH200951;B. BH200954
Fig. 1 Colony morphology of two mangrove mud actinomycetes

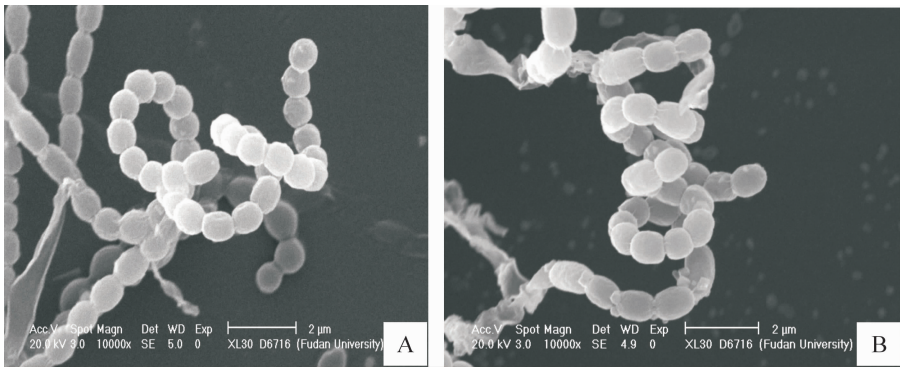


图 2 2 株红树林淤泥放线菌气生菌丝的扫描电子显微镜观察(×10 000)
A. BH200951;B. BH200954

2.2 2 株红树林淤泥放线菌的抗菌活性

表 1 表明,菌株 BH200951 和 BH200954 发酵液对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、大肠埃希菌、普通变形杆菌均有较好的抑制作用,其中 BH200951 的发酵液对 G⁺ 菌的抑制作用要强于 G⁻ 菌,而 BH200954 发酵液的抑菌作用却与之相反;二者发酵液均对铜绿假单胞杆菌、真核细胞型微生物

白假丝酵母菌无抗菌活性。
2.3 2 株红树林淤泥放线菌的生理生化特性
经检测可知,BH200951 和 BH200954 菌株都能使明胶液化,淀粉、纤维素水解,牛奶凝固而不胨化;不产生硫化氢、不还原硝酸盐;可以葡萄糖、果糖、半乳糖、木糖、甘露糖、蔗糖、甘油作为碳源生长,不能利用棉子糖、阿拉伯糖、鼠李糖。

表 1 BH200951 和 BH200954 菌株发酵液的抗菌活性

Table 1 Antibacterial activity of fermentation broth of BH200951 and BH200954

菌株 Strain	抑菌圈直径 mm Inhibition zone diameter		
	BH200951	BH200954	链霉素 <i>Streptomycin</i>
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	32	15	21
表皮葡萄球菌 <i>S. epidermidis</i>	27	16	20
大肠埃希菌 <i>E. coli</i>	16	29	24
普通变形杆菌 <i>P. vulgaris</i>	19	28	25
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	—	—	—
白假丝酵母菌 <i>C. albicans</i>	—	—	—

2.4 基于基因序列构建的 2 株红树林淤泥放线菌的系统发育树分析

本研究测得菌株 BH200951 和 BH200954 的基因 16 S rDNA 序列全长分别为 1 488 和 1 489 bp。2 株放线菌的 16 S rDNA 序列已登陆 GenBank, 序列号分别为 GU265720 和 GU265721。用 Blast 软件从 GenBank、EMBL 等数据库中搜索相似序列, 然后采用邻接法构建 BH200951、BH200954 与其他相关菌株的系统发育树, 结果(图 3)显示, BH200951 与链霉菌属(*Streptomyces aurantiogriseus*) AY999773 菌株系统发育关系密切, BH200954

与仙台链霉菌(*Streptomyces sindenensis*)系统发育关系密切。一般情况下, 与典型菌株相比, 16 S rDNA 序列同源性在 98% 以上的菌株可以认为是新菌株, 同源性在 96%~97% 的菌株可以认为是新种, 同源性在 93%~95% 的菌株可以认为是新属。综合形态学特征、培养特征、生理生化特征及系统发育树的分类结果, 可知 BH200951 为链霉菌属(*Streptomyces aurantiogriseus*) AY999773 的变种, BH200954 初步被鉴定为链霉菌属的有效发表种仙台链霉菌。

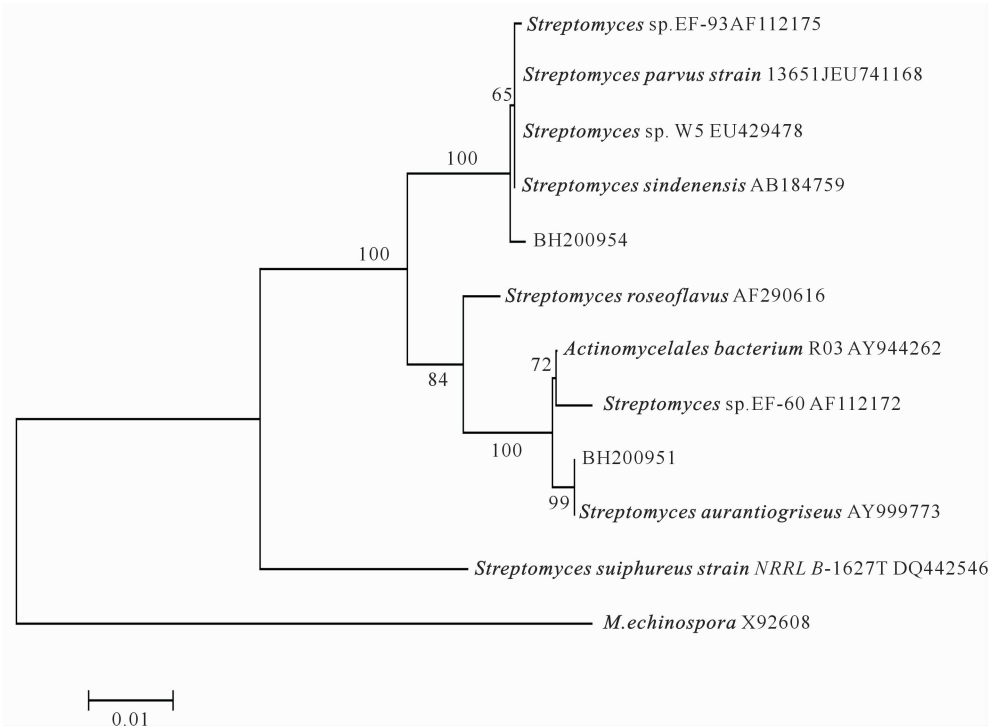


图 3 基于 16 S rDNA 基因序列的 2 株红树林淤泥放线菌与其他相关典型菌株的系统发育树
图中数据为同源性(%)

Fig. 3 Phylogenetic tree of two mangrove mud and other related actinomycetes strains based on 16 S rDNA gene
Data in figure is similarity (%)

3 讨 论

遗传多样性分析表明,链霉菌属产生的抗生素

物质的总数约有上万种,而目前发现的只是很少一部分^[12]。本研究根据形态特征、培养特征、生理生化特性和系统发育特征,从广西北海红树林海洋淤

泥中分离、纯化的 2 株典型放线菌 BH200951 和 BH20095,均具有链霉菌属菌株的典型特征,属于链霉菌属。本试验结果显示,BH200951 和 BH200954 的发酵液均具有明显抗菌活性,其抗菌谱不同,其中 BH200951 发酵液对 G^+ 菌抑制作用强,而 BH200954 发酵液对 G^- 菌具有较强的抑制作用。

随着陆生资源的不断枯竭、新的疾病及致病菌抗药性等问题不断出现,发现新菌种以寻找新型抗生素已迫在眉睫^[13]。与其他微生物相比,放线菌是一类具有更为丰富生物活性物质的生物资源。鉴于红树林放线菌在种类和数量上,都明显比菜园、湖畔、海泥等丰富,故从红树林放线菌中寻找新型抗肿瘤活性物质,也成为目前研究的一个热点^[14-15]。本研究下一步将继续从红树林海洋淤泥中分离、鉴定出更多的放线菌,旨在从中能筛选出能应于临床的抗菌、抗肿瘤物质。

[参考文献]

[1] 王长云,邵长伦,傅秀梅,等. 中国海洋药物资源及其药用研究调查 [J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2009,39(4):669-675.
Wang C Y,Shao C L,Fu X M,et al. The Chinese marine research resources and medicinal drugs survey [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science Edition,2009,39(4):669-675. (in Chinese)

[2] Yang R Y,Li C,Lin Y,et al. Lactones from a brown alga endophytic fungus(No. ZZF36)from the South China Sea and their antimicrobial activities [J]. Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters,2006,16(16):4205-4208.

[3] Lin P,Zhang Y B,Deng A Y,et al. Microflora and antimicrobial activities of soil microorganisms in mangrove forests in the Jiulong Estuary,China [J]. Acta Ocean Sin,2005,27(3):133-141.

[4] 彭建柳,陈育,袁学文. 海洋微生物抗肿瘤活性物质的研究进展 [J]. 国际医药卫生导报,2009,15(12):125-128.
Peng J L,Chen Y,Yuan X W. Sea microorganism anti-tumor active material research development [J]. International Medicine & Health Guidance News,2009,15(12):125-128. (in Chinese)

[5] 傅秀梅,王亚楠,邵长伦,等. 中国红树林资源状况及其药用研究调查:Ⅱ. 资源现状、保护与管理 [J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2009,39(4):705-711.
Fu H M,Wang Y N,Shao C L,et al. Mangrove resources in China and its medicinal research:Ⅱ. Resource situation,pro-

tect,and manage [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science Edition,2009,39(4):705-711. (in Chinese)

[6] 魏玉珍,张玉琴 赵莉莉,等. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定 [J]. 微生物学通报,2010,37(6):823-828
Wei Y Z,Zhang Y Q,Zhao L L,et al. The Guangxi mountain pass mangrove forest endogenous ray fungusseparation,screening and appraise the [J]. Microbiology,2010,37(6):823-828. (in Chinese)

[7] 黄大林,陈森洲,徐雅娟. 广西红树林土壤放线菌的分离和 DNA 的提取方法 [J]. 广西医学,2008,30(11):1157-1159.
Huang D L,Chen S Z,Xu Y J. Guangxi mangrove forest soil ray fungi separation and DNA extraction method [J]. Guangxi Medicine,2008,30(11):1157-1159. (in Chinese)

[8] 周庭银. 临床微生物学诊断 [M]. 上海:上海科学技术出版社,2007:33-49.
Zhou T Y. Clinical microbiology diagnosis [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Publishing House,2007:33-49. (in Chinese)

[9] 吴文龙,段淑蓉,李文均,等. 三株杀粘虫放线菌的分类鉴定 [J]. 微生物学报,2004,44(5):567-570.
Wu W L,Duan S R,Li W J,et al. Three killed separata isolation and identification [J]. Acta Microbiologica Sinica,2004,44(5):567-570. (in Chinese)

[10] 陈义光,李文钧,崔晓龙,等. 具抗肿瘤活性放线菌菌株 YIM90022 的分离和系统发育分析 [J]. 微生物学报,2006,46(5):696-701.
Chen Y G,Li W J,Cui X L,et al. Actinomyces strain YIM90022 with antitumor activity separation and phylogenetic analysis microbiology [J]. Acta Microbiologica Sinica,2006,46(5):696-701. (in Chinese)

[11] 陈义光,张晓蓉,张丽,等. 具抗菌活性海洋放线菌菌株 JMC06001 的分离和鉴定 [J]. 微生物学通报,2008,35(1):40-44.
Chen Y G,Zhang X R,Zhang L,et al. Marine bacteria strains JMC06001 with antibacterial activity of isolation and identification of the bulletin [J]. Microbiology,2008,35(1):40-44. (in Chinese)

[12] Tamura K,Dudley J,Nei M,et al. MEGA4:molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. Mol Biol Evol,2007,24:1596-1599.

[13] Katharine S. tIS biofuels a field in ferment [J]. Nature,2006,444:673-676.

[14] Lamk S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes [J]. Curr Opin Microbiol,2006,9(3):245-251.

[15] Moore B S,Kalaitz J A,Xiang L K. Exploiting marine actinomycete biosynthetic pathways for drug discovery [J]. Antonie Van Leeuwenhoek,2005,87(1):49-57.