

大香格里拉土壤放线菌组成分析及生物活性测定

曹艳茹¹, 姜怡^{1,2}, 徐丽华^{1*}

(¹ 云南大学云南省微生物研究所, 微生物药物国家工程研究中心, 昆明 650091)

(² Leibniz-Institut für Meereswissenschaften, IFM-GEOMAR, Düsternbrooker Weg 20, D-24105 Kiel, Germany)

摘要 【目的】探究大香格里拉地区的土壤放线菌组成及其抑菌和酶活性, 为放线菌新药物先导化合物和高活性酶的筛选提供资源。【方法】从大香格里拉地区不同海拔高度采集 220 份土样, 用 4 种培养基, 分别进行了常温放线菌和低温放线菌的分离。从常温放线菌中选择 25 株代表菌株进行了初步分类鉴定。采用琼脂扩散法, 检测了其对于 4 株细菌和 7 株农作物致病真菌的抑菌活性; 利用特异性引物扩增法, 筛选了其聚酮合酶(PKS I、PKS II)基因、非核糖体多肽合成酶(NRPS)基因和多烯类化合物合成酶(CYP)基因。同时, 检测了低温菌的多种酶活性。【结果】25 株常温代表菌的系统发育分析显示它们分属于放线菌目的 6 个亚目、12 个科、15 个属。其中 14 株菌的 NRPS 及 11 株的 CYP 基因筛选呈阳性。低温条件下分离到的 111 株放线菌, 88% 属于耐冷菌, 12% 是嗜冷菌, 它们中的大部分能利用明胶、纤维素、甲壳素等。【结论】研究结果显示, 大香格里拉森林土壤蕴涵着种类和活性丰富的放线菌, 为放线菌资源的开发利用和保护提供了新依据。

关键词: 大香格里拉土壤; 放线菌组成; 生物活性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0105-05

自从 20 世纪 40 年代抗生素问世以来, 抗生素为维护人类的健康建立了不可磨灭的功勋。在生长促进及动物的疾病治疗中, 抗生素也发挥了重要的作用。正因如此, 每年发现的抗生素种类在迅速的增加。2002 年已达 22000 多种, 其中放线菌产生的约 12000 种^[1], 可见放线菌是抗生素的重要来源之一。为了减少放线菌活性物质的重复发现率, 从人迹罕至的原始环境收集样品, 分离尽可能多的未知放线菌, 是一条有效途径。大香格里拉地区是放线菌学家尚未涉足的地区, 有关放线菌多样性的研究还未见报道。本文报道该地区土壤放线菌分离鉴定及其部分生物活性的结果。

1 材料和方法

1.1 大香格里拉的自然概貌及样品收集

该地区属于横断山脉, 地处川滇藏交界的大三角地区, 西至西藏林芝, 东至四川泸定, 北至若尔盖, 南到云南丽江。大体位于东经 94°~102°, 北纬 26°~34° 的范围之内。梅里雪山、白芒雪山、哈巴雪山、玉龙雪山、贡嘎山、年保玉则雪峰、南迦巴瓦峰等组成了庞大的雪山群, 怒江、澜沧江、金沙江、雅砻江、大渡河、岷江, 自北向南, 穿流其间, 从江底到山顶, 高差达 6000 以上。采样地区分布其间, 最高处 5250 m, 最低处 1950 m, 大部分都在 3000 m 以上, 绝大部分属于暗棕壤和草甸土(黑粘土), 腐殖质层超过

基金项目: 国家“973 项目”——重大基础研究发展规划项目(2004CB719601); 国家自然科学基金(30560001, 30600001); 国家科技部重点国际合作项目(2006DFA33550); 云南省国际合作计划(2005GH21); 云南省自然科学基金(2004 C0002Q)

* 通信作者。Tel: +86-871-5035263/5034139; Fax: +86-871-5173878; E-mail: lihxu@ynu.edu.cn

作者简介: 曹艳茹(1983-), 女, 内蒙古人, 硕士研究生, 从事放线菌资源研究。E-mail: yanrucao3@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-07-16; 修回日期: 2008-10-13

25 cm₆那里的植被保护较好,基本上属于原始植被,是我国生物多样性最丰富的地区之一。1950 m~3000 m为常绿阔叶林带,以栎树及松柏科植物为主;3000 m~4000 m为高山针叶林;4000 m~5250 m为高山草甸及低矮灌丛和高山流石滩^[2]。

从西藏的波密,八宿,江达;云南的丽江玉龙雪山,中甸,白芒雪山;四川的得荣,乡城,理塘,垭拉雪山,雅江,康定,塔公草原,八美,丹巴,甲居藏寨,中路乡,梭坡,牦牛沟,折多山,泸定,贡嘎山,新都桥,九龙,沙坪,凉山,冕宁等地的高山针叶林,高山草甸,原始常绿阔叶林采集土样220份。其中从1950 m~3000 m、3000 m~4000 m和4000 m~5250 m分别采集80、80和60份。每份样品分别取10 cm~20 cm深的3~10个穴的土壤混合,置于无菌封口袋。

1.2 菌体的分离

1.2.1 分离培养基:用4个培养基,YIM 7(改良HV培养基,加1 g KCl/L)^[3],加制霉菌素100 mg/L,奈啶酸25 mg/L。YIM 17(改良甘油-门冬酰胺琼脂)^[4],加K₂Cr₂O₇ 50 mg/L。YIM 37(组氨酸-棉子糖)^[5],加利福平25 mg/L,制霉菌素100 mg/L,放线菌酮50 mg/L,奈啶酸25 mg/L。YIM 212(海藻糖-脯氨酸)^[6],加制霉菌素100 mg/L,放线菌酮50 mg/L,奈啶酸25 mg/L。

1.2.2 放线菌分离:土样充分混合,取2 g于室温自然风干1周,于80℃干热处理1 h。将土样装入18 mL含0.1% Na₄P₂O₄的无菌水溶液中,120 r/min振荡1 h,再用160 w超声波清洗仪(型号规格:SK3300H)振荡15 s,然后稀释成10⁻³悬液涂布平板。28℃培养7~35 d后,挑取单菌落于改良甘油-门冬酰胺琼脂和YIM 38号培养基^[7]。

选择30份3700 m以上海拔采集的土样,用YIM 17培养基,分别在4℃、8℃培养30 d,分离低温

放线菌。同时,按文献[4,8]的方法对其进行了酶活性的测定。

1.3 抑菌实验及4类化合物合成基因筛选,放线菌的鉴定

均按文献[9]使用的方法进行。

2 结果和讨论

2.1 可培养放线菌的组成

2.1.1 不同培养基的分离效果:用4种培养基,从220份土样共分离到2433株放线菌(表1)。YIM 17培养基分离的放线菌中68%是链霉菌,32%是非链霉菌;YIM 37分离的菌株61%是链霉菌;YIM 7分离的菌株则是链霉菌和非链霉菌大体各半;YIM 212能分离到59%非链霉菌。这些实验和以前我室的多次实验结果表明,YIM 212和YIM 7是分离非链霉菌较好的培养基。值得一提的是,在K₂Cr₂O₇ 50 mg/L的YIM 17号培养基上没有真菌生长,给放线菌的分离带来极大方便。所以50 mg/L的重铬酸钾可作为分离放线菌的真菌抑制剂。制霉菌素100 mg/L,放线菌酮50 mg/L,奈啶酸25 mg/L也是一组细菌和真菌的良好抑制剂。

2.1.2 不同海拔的放线菌数量:从1950 m~3000 m采集的80份土样,共分离到放线菌1461株,平均每个土样分离到约18株;从3000 m~4000 m的80份土样分离到693株放线菌,平均每份土样分离到放线菌约9株;从4000 m~5250 m的60份土样分离到279株菌,每份约5株(表1)。海拔对放线菌分布的影响是多方面的,但主要因素是温度。随着海拔升高,温度逐渐降低,3700 m以上,终年积雪。而4300 m以上的高山,主要是流石滩,有机质少。因此放线菌的数量随海拔的升高而逐渐降低。

表1 不同海拔高度土样分离到的放线菌数量

Table 1 Actinomycetes Numbers isolated in samples collected at different altitudes

Altitude/m	YIM7		YIM17		YIM37		YIM212		Total
	Streptomycete	Other	Streptomycete	Other	Streptomycete	Other	Streptomycete	Other	
1950~3000	164	187	172	69	178	105	228	358	1461
3000~4000	94	90	67	55	98	58	105	126	693
4000~5250	41	59	54	16	29	30	22	28	279
Total	299	336	293	140	305	193	355	512	2433
%	47	53	68	32	61	39	41	59	

2.1.3 纯培养放线菌的组成:分离到的2433株纯培养放线菌都用于生物活性的高通量筛选。同时,根据不同培养基上的菌落形态、颜色及经验,选出

25株,进行分类鉴定和4种化合物合成基因及抗菌活性测定。

测定16S rRNA基因的部分序列(700~900 bp),

通过 BLAST 搜索、CLUSTAL X 多序列比对及系统进化树的构建,确定了 25 株菌的系统发育地位。结果显示(表 2),25 株菌分别属于 6 个亚目、12 个科、15 个属。迄今为止,已描述的放线菌有 11 个亚目、48 个科。从大香格里拉就分离到 6 个亚目、12 个科的放线菌,可见这个地区土壤放线菌的多样性十分丰

富。

根据《放线菌系统学》^[10]的统计,16S rDNA 序列相似性在 99% 以下,有 50% 的可能性是新种;98% 以下,有 90% 可能是新种。在这 25 个菌株中,有 5 个菌株与已知菌的相似性都在 98% 以下,它们都有可能是新种。

表 2 25 株放线菌和与其系统发育关系最密切的菌株

Table 2 Phylogenetic nearest neighbors of 25 actinomycete strains as determined by analysis of the first 700 nucleotides of the 16S rRNA gene sequence

Suborder	Family	Strain (GenBank/ EMBL/ DDBJ Accession No.)	Nearest phylogenetic neighbor in the 16S r RNA gene sequence database	Similarity/ %	
<i>Micrococineae</i>	<i>Micrococcaceae</i>	YIM 48797 (EU877946)	<i>Kocuria palustris</i>	100	
		YIM 48832 (EU860980)	<i>Arthrobacter agilis</i>	99.7	
		YIM 48833 (EU860981)	<i>Arthrobacter albus</i>	99.5	
	<i>Microbacteriaceae</i>	YIM 48810 (EU860979)	<i>Agromyces subbeticus</i>	97.6	
		YIM 48843 (FJ042780)	<i>Mycetocola tolaasinivorans</i>	96.7	
	<i>Cellulomonadaceae</i>	YIM 48801 (EU860995)	<i>Oerskovia paurometabola</i>	99.9	
	<i>Promicromonosporaceae</i>	YIM 48826 (EU860975)	<i>Promicromonospora cymbopogonis</i>	99.0	
		YIM 48831 (EU860976)	<i>Promicromonospora sukumoe</i>	98.4	
		YIM 48839 (EU860978)	<i>Promicromonospora sukumoe</i>	99.3	
		YIM 48840 (EU860977)	<i>Promicromonospora citrea</i>	98.4	
		<i>Corynebacterineae</i>	<i>Nocardiaceae</i>	YIM 48803 (EU860990)	<i>Nocardia jiangxiensis</i>
	YIM 48808 (EU860991)			<i>Nocardia alba</i>	98.8
	YIM 48813 (EU860988)			<i>Nocardia lijiangensis</i>	98.7
	YIM 48818 (EU860989)			<i>Nocardia soil</i>	98.7
	YIM 48817 (EU860993)			<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	100
<i>Tsukamurellaceae</i>	YIM 48834 (EU860994)		<i>Tsukamurella strandjordae</i>	99.4	
<i>Pseudonocardineae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>		YIM 48807 (EU860992)	<i>Pseudonocardia hydrocarbonoxydans</i>	97.5
	<i>Actinosynnemataceae</i>		YIM 48827 (EU860982)	<i>Lentzea albida</i>	97.7
<i>Streptosporangineae</i>	<i>Thermomonosporaceae</i>		YIM 48828 (EU860983)	<i>Lentzea albidocapillata</i>	97.8
			YIM 48842 (FJ042781)	<i>Actinomadura vinacea</i>	99.4
	<i>Streptosporangiaceae</i>	YIM 48822 (FJ042782)	<i>Streptosporangium amethystogenes</i>	99.4	
<i>Propionibacterineae</i>	<i>Nocardioidaceae</i>	YIM 48812 (FJ042783)	<i>Nocardioides fulvus</i>	100	
		YIM 48824 (FJ042784)	<i>Nocardioides albus</i>	99.9	
<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	YIM 48821 (FJ042785)	<i>Streptomyces mauvecolor</i>	99.6	
		YIM 48829 (FJ042786)	<i>Streptomyces glomeroaurantiacus</i>	99.3	

2.1.4 低温放线菌:使用 30 份 3700 m 以上海拔采集的土样,以 YIM 17 培养基,在 4℃ 培养 30 天后分离,获得 43 株放线菌,其中链霉菌 38 株,小单孢菌 3 株,假诺卡氏菌 2 株;8℃ 培养后分离,获得 68 株放线菌,其中链霉菌占 52 株,假诺卡氏菌 6 株,小单孢菌 5 株,诺卡氏菌 3 株,马杜拉放线菌 2 株。以上数据表明,链霉菌数量在低温环境中仍占据主导地位。这 111 株在 0℃ 都能生长。其中 17 株在 37℃ 能生长,最适在 28℃,81 株在 37℃ 不能生长,最适生长在 14℃ ~ 28℃,这 97 株都属于耐冷放线菌。另外 13 株(12 株链霉菌、1 株诺卡氏菌)的最适生长在 10℃ ~ 14℃,在 28℃ 不生长,0℃ 生长中等,这属于嗜冷放线菌(psychrophilic actinomycetes)。

利用明胶,81 株能利用纤维素,78 株利用甲壳素,47 株水解酪素,17 株水解淀粉。可见在高寒山区,放线菌是其生态系统的重要成员,在土壤有机质的分解中扮演重要角色。

2.2 抗菌活性及 4 种化合物合成基因筛选的结果

6 个放线菌亚目 25 株放线菌的抗菌活性示于表 3。它们中有 3 株具有抗炭疽活性。各有 2 株抗 *Fusarium graminearum*, *Gonmatopyricularia amomi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, 其中 1 株链霉菌对 7 种实验菌有拮抗作用。在这 25 个菌株中,没有 1 株能抗 *Phytophthora nicotianae*, *Protomyces macrosporus* 和 *Escherichia coli*。总体上,大香格里拉的放线菌的抗菌活性要比武陵山的低^[9]。筛选到的有抑菌活性的菌株可为解决一

测定了其中 100 株放线菌的酶活性,有 94 株能

些农业问题(如生物农药、复合菌剂)提供很好的开发资源。

25株放线菌的基因筛选结果示于表3。25个实验菌株中,有14株菌的非核糖体含硫多肽类(non-ribosomal thiopeptide)合成基因(NRPS)及11株菌的多烯类化合物合成基因(CYP)成阳性,各占约50%;其中棒杆菌亚目有5/6的菌株有NRPS基因,但仅1/6的菌株有CYP基因。而有PKS I和PKS II型聚酮化合物合成基因的菌株仅分别为3、2株,仅占8%和12%。仅2个丙酸杆菌亚目的菌株CYP成阳性。这些结果表明,大香格里拉分离的放线菌,具有PKS I和PKS II型聚酮化合物合成基因的比例低于武陵山分离的菌株^[9]。进行基因筛选的优点是,一旦从含有某种基因簇的菌株获得新化合物,就可以通过组合生物合成等手段,研究化合物的合成途径,增加化合物的多样性,进行化合物的修饰从而提高其活性。

表3 抗菌活性及化合物合成基因筛选阳性的菌株数

Table 3 Antimicrobial activities and distribution of biosynthetic genes in 25 isolates

Test	1	2	3	4	5	6	Total
Amount of tested strains	10	6	3	2	2	2	25
Amount of positive strains							
PKS- I	1	0	2	0	0	0	3
PKS- II	1	0	1	0	0	0	2
NRPS	3	5	2	0	2	2	14
CYP	6	1	2	2	0	0	11
<i>Phytophthora nicotianae</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alternaria alternata</i>	0	0	0	0	1	0	1
<i>Fusarium graminearum</i>	0	0	1	0	1	0	2
<i>Colletotrichum</i> sp.	0	1	1	0	1	0	3
<i>Gonmatopyricularia amomi</i>	1	0	0	0	1	0	2
<i>Protomyces macrosporus</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus niger</i>	1	0	0	0	0	0	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	2	0	2
<i>Bacillus megaterium</i>	0	0	0	0	2	0	2
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0	0	2	0	2
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0

1: *Micrococccineae*; 2: *Corynebacterineae*; 3: *Pseudonocardineae*; 4: *Propionibacterineae*; 5: *Streptomycineae*; 6: *Streptosporangineae*.

近些年来,为了从未知菌获得尽可能多的新先导化合物,许多公司和实验室把注意力转向极端环境和海洋环境^[11],这无疑是可以取的。但这并不意味着陆地环境没有未知菌了。根据上述结果,我们认为陆地“原始环境”(即受现代社会和人为干扰最少的环境,如人迹罕至的原始森林及其它环境)仍然蕴

藏大量未知放线菌,关键是分离方法和研究人员的经验十分重要。

由于酶制剂高效、专一、环保等特点,酶工业在近几年快速迅猛的发展起来。但从动植物中制备酶制剂较麻烦,数量也有限,人们普遍看好通过微生物大规模培养,然后从中提取酶,以获取大量酶制剂的方法。同时,随着生物工程和转基因技术在酶制剂工业的应用,也可以将酶进行改性和基因重组从而获得预期效果的酶制剂。微生物就是生产及改造酶制剂的重要材料和载体。不同来源的放线菌也是筛选和获取多种酶制剂的重要来源。目前,低温酶的需求量很大。本研究分离到的具有多种酶活的低温菌,为高酶活低温酶的开发提供了研究材料。

参考文献

- [1] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites a personal review. *Journal of Antibiotics* 2005 58(1):1-26.
- [2] 侯学煜. 中国植被图集. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology* 1987 65 501-509.
- [4] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1966 16 313-340.
- [5] 姜成林, 徐丽华. 微生物资源学. 北京: 科学出版社, 1997.
- [6] 姜怡, 唐蜀昆, 陈华红, 等. 稀有放线菌分离方法. 微生物学通报(*Microbiology*) 2006 33(1):181-183.
- [7] Jiang Y, Tang SK, Wiese J, et al. *Streptomyces hainanensis* sp. nov., a novel member of the genus *Streptomyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007 57 2694-2698.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] 曹艳茹, 姜怡, 陈义光, 等. 武陵山放线菌多样性. 微生物学报(*Acta Microbiol Sinica*) 2008 48(7):1-7.
- [10] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学. 北京: 科学出版社, 2007.
- [11] Jiang Y, Wiese J, Xu LH, et al. Marine actinobacteria, an important sources of novel secondary metabolites with bioactivities. *Chinese Journal of Antibiotics* 2007 32(12):705-722.

Diversity and bioactivity analysis of actinomycetes isolated from Grand Shangri-La soil

Yanru Cao¹, Yi Jiang¹, Lihua Xu^{1*}

(¹ Yunnan Institute of Microbiology, National Engineering Center for Research of Microbial Pharmaceuticals, Yunnan University, Kunming 650091, China)

(² Leibniz-Institut für Meereswissenschaften, IFM-GEOMAR, Düsterbrooker Weg 20, D-24105 Kiel, Germany)

Abstract [Objective] To obtain new pharmaceuticals and enzymes with high activity, we studied the composition as well as antimicrobial and enzyme activities of actinomycetes in Grand Shangri-La. **[Methods]** Using 4 media, we isolated mesophilic and psychrophilic actinomycetes from 220 soil samples collected from areas with different altitudes in Grand Shangri-La. Twenty-five representative isolates were phylogenetically analyzed based on their 16S rRNA gene sequences. Antimicrobial activities against four bacteria and seven fungi were tested using agar well diffusion method. Genes encoding type I and II polyketide synthases (PKS I, PKS II), nonribosomal peptide synthase (NRPS) and polyene cytochrome P450 hydroxylase (CYP) were screened by PCR. Furthermore, several enzyme activities of psychrophilic actinomycetes were examined. **[Results]** The 25 representative strains belonged to 6 suborders, 12 families and 15 genera of the order Actinomycetales. For NRPS and CYP genes screening, positive strains were 14 and 11, respectively. Among the 111 actinomycetes isolated under low-temperature conditions, 88% were psychrotroph strains, 12% were psychrophilic actinomycetes, and most of them utilized gelatin, cellulose and chitin. **[Conclusion]** Actinomycetes diversity is rich in Grand Shangri-La, and has the potential for conservation and utilization of actinomycetes resources.

Keywords: Grand Shangri-La soil; actinomycetes composition; bioactivities

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Major Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719601), the National Natural Science Foundation of China (30560001, 30600001), International cooperative Program of Ministry of Science of Technology of China (2006DFA33550), the Yunnan Provincial International cooperative Program (2005GH21), the Yunnan Provincial Natural Science Foundation (2004 C0002Q).

* Corresponding author. Tel: +86-871-5035263/5034139; Fax: +86-871-5173878; E-mail: lihxu@ynu.edu.cn

Received: 16 July 2008 / Revised: 13 October 2008

《微生物学报》答作者问——关于审稿

问: 我想知道我的稿件的处理状态, 如何查询?

答: 您可以登录网上查稿区, 输入您的用户名、密码, 即可查询到审稿状态。如果不是太明白远程中获取的信息, 您也可以通过 e-mail 询问, 请注意务必要提示稿件编号, 编辑部会在收到您的来信的当天或者次日及时给予回复。

问: 我想尽早得到审稿结果, 或者提前发表, 有没有好的办法能使审稿老师快点。比如我们增加审稿费等方法?

答: 如上述所言, 我们已经告知了本刊处理稿件的程序和大致时间进度。

- (1) 在作者向我刊投稿之前, 应详细了解我刊的规定。审稿人评审一篇文章, 并给出谨慎的评审意见是需要一定时间的。所以, 作者在投稿之前应该留出足够多的时间给编辑部, 以便于进行评审。我们的承诺是在 2 个月之内给予答复, 5~7 个月之内刊出。
- (2) 如要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊编委会讨论并通过后, 可予提前刊出, 无需另加任何费用。

问: 我的文章现已审查完毕, 并收到了编辑部发来的“审稿意见”。我想咨询, 如果文章修改后, 再次投递, 是否还需要交稿件受理费? 是否仍然用原论文编号提交?

答: 这要分两种情况,

- (1) 如果你的文章已经被通知“退稿”了, 那么修改之后再投来的文章将按“新稿件”处理, 从程序上来讲和新投稿件是一样的, 仍需要缴纳稿件受理费。但是为便于稿件审理, 请作者在投稿时在文题的后面加上“原稿件号+修后再投”字样。
- (2) 如果是编辑部在审稿意见中要求您修改后再经本刊“复审”, 则不作为新稿处理, 请作者直接将修改稿上传到远程系统中, 不再另交稿件受理费。