

具抗菌活性海洋放线菌菌株 JMC 06001 的 分离和鉴定

陈义光^{1,2} 张晓蓉¹ 张丽¹ 刘祝祥¹ 彭德姣¹ 肖怀东¹ 黄苛¹ 陈奇辉¹ 徐丽华^{2*}

(1. 吉首大学 生物资源与环境科学学院 生态研究所 吉首 416000)

(2. 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)

摘要: 从湛江硇洲岛高盐泥样中分离到一株微嗜盐放线菌 JMC 06001, 该菌株的发酵产物具有很强的抗菌活性。菌株 JMC 06001 在多数培养基上生长良好, 气生菌丝白色, 基内菌丝淡黄色至浅棕色。在燕麦琼脂 (ISP 3)、甘油-天门冬酰胺琼脂 (ISP 5)、葡萄糖-天门冬酰胺琼脂及马铃薯浸汁琼脂上产生黄色可溶性色素, 在酵母膏-麦芽膏琼脂 (ISP 2)、蛋白胨酵母膏铁盐琼脂 (ISP 6) 和营养琼脂上产生棕色可溶性色素。生长温度范围为 4°C ~ 40°C, 最适生长温度 28°C。生长 pH 范围为 6.0 ~ 9.0, 最适 pH 7.0。能在含 0 ~ 1.5 mol/L NaCl 的培养基上生长, 最适生长盐浓度为 0.2 ~ 0.5 mol/L NaCl。根据其形态学特征、生理生化特征、细胞化学分类特征和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析结果, 菌株 JMC 06001 被鉴定为链霉菌属 (*Streptomyces*) 的有效发表种波赛链霉菌 (*S. peucetius*) 的一个菌株。

关键词: 海洋放线菌, 链霉菌属, 抗菌活性, 生物学特征, 系统发育分析

Isolation and Identification of Marine Actinomycete JMC06001 Exhibiting Strong Antibacterial Activity

CHEN Yi-Guang^{1,2} ZHANG Xiao-Rong¹ ZHANG Li¹ LIU Zhu-Xiang¹ PENG De-Jiao¹
XIAO Huai-Dong¹ HUANG Ke¹ CHEN Qi-Hui¹ XU Li-Hua^{2*}

(1. College of Bio-resources and Environmental Science, Institute of Ecology, Jishou University, Jishou, 416000)

(2. Yunnan Institute of Microbiology and Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources,
Yunnan University, Kunming, 650091)

Abstract: One slightly halophilic marine actinomycete strain JMC 06001 was isolated from a saline mud sample collected from the Island Naozhou in the South China Sea, near Zhanjiang, a city of southern China. The fermentation broth of strain JMC 06001 strongly inhibited the growth of *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* and *Proteus vulgaris*. The combination of morphology, physiological and biochemical characteristics, chemotaxonomic data and 16S rRNA gene sequence analysis supported the view that strain JMC 06001 belong to a known species of the genus *Strepto-*

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973 项目”(No. 2004CB719601); 福特基金项目(07JDPHE031, 07JDPHE053); 吉首大学人才引进基金项目; 湖南省教育厅科学研究项目(C05168)

* 通讯作者: Tel: 0871-5035263; 信箱: lihxu@ynu.edu.cn

收稿日期: 2007-01-22; 接受日期: 2007-07-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

myces, *S. peucetius*. The strain studied grown well on most media tested, with white aerial hyphae and pale yellow to pale brown substance hyphae. Yellow diffusible pigments were produced on oatmeal agar (ISP 3), potato extract agar and glucose/asparagines agar, and pale brown to deep brown diffusible pigments were produced on yeast extract/malt extract agar (ISP 2), glycerol/asparagine agar (ISP5), peptone-yeast ext-Fe agar (ISP 6) and nutrient agar. Growth occurred at 4 °C~40 °C and pH 6.0~9.0, with optimum growth at 28 °C and pH 7.0. The tolerant range of NaCl was 0~1.5 mol/L, with best growth occurring in media containing 0.2~0.5 mol/L NaCl.

Keywords: Marine actinomycete, *Streptomyces*, Antibacterial activity, Biological characteristics, Phylogenetic analysis

随着人们对微生物来源药物需求的不断增加,近年来盐环境微生物(extremophile)资源研究成为科学界关注的热点领域之一^[1]。海洋环境属于地球上最大的盐环境,由于其环境的多样性使得海洋微生物具有其特殊的生理机制和独特的基因类型,具有产生新的生理活性物质的巨大潜力,因而向海洋微生物寻求药用物质和药物先导化合物成为各国的重点研究方向^[2]。在对湛江附近海域微生物资源调查过程中,从硇洲岛海滨泥样中分离到一株嗜盐放线菌菌株JMC 06001,其发酵产物对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和变形杆菌(*Proteus vulgaris*)等原核微生物有很强的抑菌活性。本文报道该菌株的分离、抑菌活性筛选和鉴定结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: JMC 06001 分离自湛江硇洲岛海潮汐带泥样; 抗菌活性测定所用指示菌由本室保藏。

1.1.2 主要试剂和培养基: DNA提取与纯化、PCR扩增所用酶、引物和试剂同文献^[3]。Marine agar 2216 (MA) 购自Difco公司, ISP2(International *Streptomyces* Projects)系列培养基按相关文献配制^[4]。发酵培养基组成: 葡萄糖 20 g, 甘露醇 20 g, 大豆粉 20 g, 蛋白胨 2 g, NaCl 10 g, CaCO₃ 3 g, (NH₄)₂SO₄ 5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 0.2 g, 水 1000 mL, pH 7.0。

1.2 菌株分离和培养

从湛江硇洲岛海潮汐带采集含盐泥样, 室温风干。120 °C处理 1 h, 采用梯度稀释平板法, 用添加 0.5 mol/L NaCl 的 ISP 2 琼脂培养基进行分离。经纯化后, 用同样的培养基培养。菌种制成冻干牛奶管, 或悬浮于添加 20% (V/V)甘油的 ISP 2 液体培养基中, 保藏于-20 °C。

1.3 发酵液抗菌活性测定

用营养琼脂培养基培养指示菌, 用管碟法^[5]直接测定摇瓶发酵液抗菌活性, 用 30 μg/mL的链霉素做对照, 每管加试液 20 μL。发酵液中有效抑菌物质的溶解性和紫外线、热和酸碱稳定性试验按常规方法进行。

1.4 表型特征和化学分类特征

形态特征、培养特征、生理生化特征和细胞化学特征按吴文龙等^[6]所用的方法进行。耐盐实验和温度实验用ISP 2、MBA琼脂培养基进行, 耐酸碱实验用ISP 2 液体培养基进行。除了在耐盐实验和耐酸碱实验中有特殊要求外, 所有培养基补充 0.2 mol/L NaCl, 调节pH 7.0, 培养温度 28 °C。

1.5 16S rRNA 基因序列测定和系统发育分析

总DNA的提取、16S rRNA基因的PCR扩增、PCR产物的纯化及对纯化后的产物测序均按崔晓龙等^[7]使用的方法进行。根据测序结果, 先利用Blast搜索软件从GenBank等数据库中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA基因序列, 用CLUSTAL X软件进行多重序列比对, 采用MEGA(Molecular Evolutionary Genetics Analysis)2.1 软件包, 用邻接法(neighbour-joining method)^[8]进行系统进化树的构建和同源性比较。

2 结果与分析

2.1 菌株的抗菌活性

抗菌实验结果见表 1。结果表明, 发酵液对藤黄八叠球菌、金黄色葡萄球菌等原核病原微生物有很好的抑制作用, 但对清酒酵母等真核微生物没有抑菌活性。

2.2 抗菌活性物质的疏水性和稳定性

对菌株JMC06001 的发酵液分别用氯仿、醋酸乙酯、正丁醇萃取, 有机相合并, 于 45 °C蒸干, 用等体积甲醇溶解, 测定其抑菌活性, 用水相做对照。结

表1 菌株 JMC 06001 发酵液的抗菌活性
Table 1 The antibacterial activity of the fermentation broth of strain JMC 06001

Test strains	Diameter of inhibition zone(mm)	
	Fermentation broth	Streptomycin (30µg/mL)
藤黄八叠球菌 (<i>Sarcina lutea</i>)	30	18
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	25	21
白色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus albus</i>)	20	20
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	15	27
变形杆菌 (<i>Proteus vulgaris</i>)	10	25
大肠杆菌(<i>E. coli</i>)	9	24
微球菌 (<i>Micrococcus luteus</i>)	8	20
清酒酵母(<i>Candida sake</i>)	—	—
白色假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>)	—	—
黑曲霉(<i>A. niger</i>)	—	—

—: 无抑菌活性 -: Negative

果表明, 抑菌物质具有较强的脂溶性, 易溶于氯仿、乙酸乙酯、正丁醇等有机溶剂, 而萃取后的水相没有抑菌活性。用紫外线照射、高温处理和强酸强碱对发酵液进行处理后, 测定其抗菌活性。结果表明抑菌活性物质具有较好光稳定性和热稳定性。发酵液在 30 W 紫外灯下 20 cm 处照射 30 min 后, 抑菌活性基本没变; 在 37℃ ~ 50℃ 之间抑菌活性非常稳定, 在 50℃ ~ 60℃ 之间有少许下降, 60℃ 以后抑菌活性趋于稳定, 100℃ 处理 1 h 后其抑菌活性仍然较高; 但抑菌活性物质的酸碱稳定性较差, 只在 pH 5 ~ 7 的条

件下有抑菌活性, 而在强酸和碱性环境下失活。活性物质的分离、纯化和结构解析等研究正在进行中。

2.3 形态和培养特征

菌株 JMC 06001 具有典型的链霉菌属 (*Streptomyces*) 的特征。菌株 JMC 06001 基内菌丝多分枝, 不断裂, 气生菌丝丰富, 孢子链直且长, 偶有波曲, 孢子呈柱状(图 1)。菌株在多数培养基上生长良好, 气生菌丝均为白色, 基内菌丝为浅黄色或浅棕色, 在燕麦琼脂(ISP 3)、甘油-天门冬酰胺琼脂(ISP 5)、葡萄糖-天门冬酰胺琼脂及马铃薯浸汁琼脂上产生黄色可溶性色素, 在酵母膏-麦芽膏琼脂(ISP 2)、蛋白胨酵母膏铁琼脂(ISP 6)和营养琼脂上产生棕色可溶性色素(表 2)。

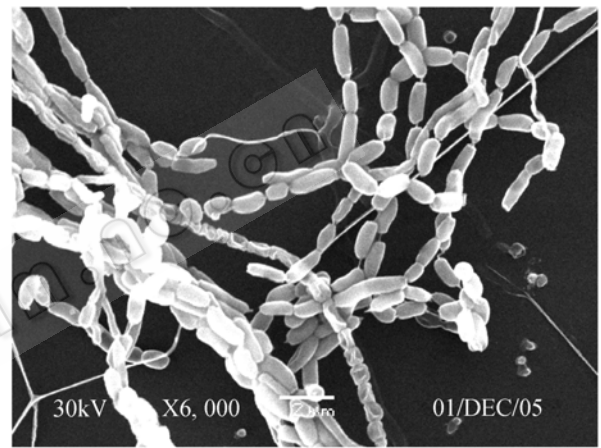


图1 菌株 JMC 06001 在添加 0.2 mol/L NaCl 的 ISP 2 琼脂培养基上于 28℃ 培养 21 d 的扫描电镜照片

Fig. 1 Morphological characteristics of strain JMC 06001 on ISP medium 2 agar at 28℃ for 21 days (6 000 ×; bar, 2 µm).

表2 菌株 JMC 06001 的培养特征
Table 2 Cultural characteristics of strain JMC06001

Medium*	Growth	Aerial mycelium	Substance mycelium	Soluble pigment
Yeast extract/malt extract agar (ISP 2)	Good	White	Pale yellow	Deep brown
Oatmeal agar (ISP 3)	Good	White	Pale yellow	Yellow
Inorganic salt/starch agar(ISP 4)	Poor	White	Light yellow	—
Glycerol/asparagine agar(ISP 5)	Good	White	Pale yellow	Pale brown
Peptone-yeast ext-Fe agar(ISP 6)	Good	White	Pale brown	Deep brown
Czapek's agar	Abundant	White	Pale yellow	—
Nutrient agar	Abundant	White	Pale brown	Brown
Potato extract agar	Good	White	Light yellow	Yellow
Glucose/asparagines agar	Moderate	White	Pale brown	Yellow

- 所有培养基补充 0.2 mol/L NaCl, 调整到 pH 7.0; ISP: International *Streptomyces* Project.^[4]; —: 不产生可溶性色素
- All media were adjusted to pH 7.0, supplemented with 0.2 mol/L NaCl; ISP, International *Streptomyces* Project.^[4]; —: Negative.

表 3 实验菌株 JMC 06001 对碳氮源的利用情况
Table 3 Utilization of carbon and nitrogen source for JMC 06001

Sole C source	Growth	Sole C source	Growth	Sole C source	Growth	Sole N source	Growth
Arabinose	+	Maltose	+	Sucrose	-	Alanine	+
Cellobiose	-	Mannitol	+	Sorbitol	+	Asparagines	+
Fructose	+	Mannose	+	Starch	+	Aspartic acid	-
Glucose	+	Raffinose	+	Trehalose	+	Glutamic acid	-
Galactose	-	Rhamnose	+	Xylose	-	Glycine	+
Glycerol	+	Ribose	+	Xylitol	+	Methionine	+
Inositol	+	Sodium acetate	+			Threonine	+
Lactose	-	Sodium citrate	+			Tyrosine	-

C: 碳; N: 氮; +: 生长; -: 不生长.

C: Carbon; N: Nitrogen; +: Positive; -: Negative.

2.4 生理生化特征

实验菌株 JMC 06001 的生长温度范围为 4~40 °C, 最适温度为 28 °C。生长 pH 范围为 6.0~9.0, 最适 pH 7.0。能在含 0~1.5 mol/L NaCl 的 ISP2 和 MBA 琼脂上生长, 最适生长盐浓度为 0.2~0.5 mol/L NaCl, 而且 NaCl 可以被 KCl 或 MgCl₂·6H₂O 代替。明胶液化、淀粉水解、H₂S 产生阳性; 不能水解 Tween20、Tween 80 和酪素(Casein); 黑色素产生、牛奶酪化、纤维素水解和硝酸盐还原阴性。菌株 JMC 06001 能利用多种物质做碳源和氮源(表 3)。

2.5 细胞化学特征

菌株 JMC 06001 全细胞水解产物中含 L-DAP、甘氨酸和天门冬氨酸等氨基酸, 含葡萄糖、半乳糖、木糖和核糖等糖类。这些结果与链霉菌属特征相符。

2.6 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

测得菌株 JMC 06001 的 16S rRNA 基因核苷酸序列全长 1463 bp。用 Blast 软件从 GenBank 等数据库中进行搜索, 发现菌株 JMC 06001 与链霉菌属(*Streptomyces*) 菌株高度相关, 说明该菌株是链霉菌属的成员。在用邻接法(Neighbor-Joining method)^[8]构建的系统进化树上, 菌株 JMC 06001 与该属的典型菌株 *S. peucetius* JCM 9920^T 以极高的 16S rRNA 基因序列相似性(sequence similarity, 99.8%) 和极高的自展值(bootstrap value, 100%) 支持聚在一个系统进化分支上(图 2), 初步表明 JMC 06001 属于链霉菌属有效发表种波赛链霉菌(*S. peucetius*) 的一个菌株。与菌株 JMC 06001 系统发育关系较密切的还有委内瑞拉链霉菌(*S. venezuelae* JCM 4526^T; sequence similarity 99.2%)、砖红链霉菌(*S. lateritius* JCM 4389^T; 99.21%)、黄灰链霉菌(*S. flavogriseus* DSM 40323^T; 98.9%)、灰色链霉菌(*S. griseus* KCTC 9080^T; 98.6%)、比基尼链霉菌(*S. bikiniensis* DSM

40581^T; 98.0%)、亚红链霉菌(*S. subrutilus* DSM 40445^T; 97.9%) 和浅紫灰链霉菌(*S. lavendulae* IFO 12343^T; 97.8%)。

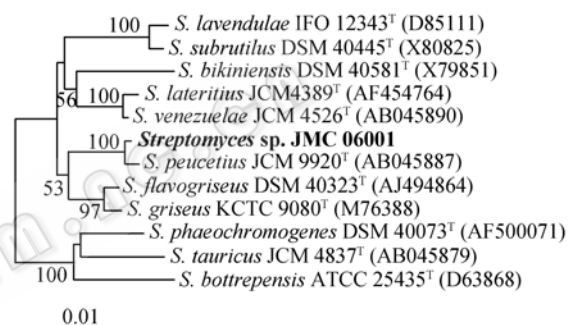


图 2 用邻接法构建的以 16S rRNA 基因序列为基础的菌株 JMC 06001 和链霉菌属(*Streptomyces*) 相关典型菌株的系统发育树状关系图

Fig. 2 Neighbor-Joining tree constructed showing the phylogenetic relationships among JMC 06001 and other related *Streptomyces* strains based on 16S rRNA gene sequences downloaded from GenBank and EMBL etc. Numerals on branches are the supporting percentage (>50%) by 1000 replicates. Bar, 1 nucleotide substitution per 100 nucleotides of 16S rRNA gene sequence.

3 小结与讨论

根据以上形态特征、培养特征、生理生化特性和系统发育分析的研究结果, 菌株 JMC 06001 具有链霉菌属(*Streptomyces*) 菌株典型的特征, 应归属于此属。菌株 JMC 06001 与波赛链霉菌(*S. peucetius*) 系统发育关系最密切, 与其以很高的 16S rRNA 基因序列相似性(99.8%) 在系统发育树状图中以极高的自展值(bootstrap value, 100%) 支持聚在一起(图 2)。因此, 菌株 JMC 06001 可以被初步鉴定为波赛链霉菌(*S. peucetius*) 的一个菌株。该菌株分离自海洋岛屿潮汐带高盐泥样, 能耐受一定浓度的盐, 最适生长盐浓度为 0.2~0.5 mol/L NaCl, 为微嗜盐菌(slight

halophile)^[9]。

链霉菌属(*Streptomyces*)菌株具有丰富的物种多样性和代谢类型多样性,是极其重要的产生天然活性产物的资源微生物。自20世纪60年代至今发现的12000余种微生物来源的新生理活性物质中,55%以上是由链霉菌属菌株产生的^[10]。目前临床上应用的抗生素约2/3来源于链霉菌属,该属产生的生物活性物质还包括抗肿瘤剂、免疫抑制剂、杀虫剂等。链霉菌菌株仍然是主要的微生物天然活性产物或药物先导化合物的产生菌^[10]。但是,随着已经发现的微生物源化合物数量的增加,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,如何用更独特的分离方法、从更多样的环境尤其是海洋等极端环境中分离筛选活性菌株成为当前微生物资源开发利用的重要研究课题^[1]。本实验研究结果表明,分离自海洋环境中的链霉菌属菌株JMC 06001能产生具有较强抗菌活性的代谢产物,说明海洋环境中的链霉菌同样是重要的活性天然产物产生菌资源。

参 考 文 献

- [1] 刘志恒. 放线菌—微生物药物的重要资源. 微生物学通报, 2005, 32(6): 143–145.
- [2] Proksch P, Edrada RA, Ebel R. Drugs from the seas—current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(2): 125–134.
- [3] 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.
- [4] Shirling EB & Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, 16(3): 313–340.
- [5] 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, pp. 2–26.
- [6] 吴文龙, 段淑蓉, 李文均, 等. 三株杀粘虫放线菌的分类鉴定. 微生物学报, 2004, 44(5): 567–570.
- [7] Cui XL, Mao PH, Zeng M, et al. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardiopsaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51(2): 357–363.
- [8] Satou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406–425.
- [9] Kushner DJ. Growth and nutrition of halophilic bacteria. In *The biology of halophilic bacteria*, Edited by Vreeland RH and Hochstein LI. Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 87–103.
- [10] 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): 321–324.

稿件规范化与标准化

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字,年份必须用全称。对科技期刊来说,凡处在计量单位和计数单位前面的数字,包括9以下的各位数字,除个别特例外,均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字,例如:一本教材,两种商品等。