

研究报告

海南东寨港真红树植物内生放线菌多样性及其抗菌活性

李静¹ 戴素娟¹ 鹿利¹ 蒋忠科¹ 刘少伟^{1,2} 姜明国² 姜蓉^{1*} 孙承航^{1*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所 北京 100050)

(2. 广西民族大学广西高校微生物与植物资源利用重点实验室 广西 南宁 530006)

摘要:【目的】勘探海南东寨港真红树植物内生放线菌多样性,为发现放线菌新物种和新抗生素奠定基础。【方法】样品经表面消毒后粉碎,用10种不同培养基分离放线菌;通过PCR扩增、测定并比对16S rRNA基因序列,开展放线菌多样性分析;通过发酵、萃取等处理方法得到四类样品,包括发酵原液、乙酸乙酯提取液及水层和菌体的丙酮浸泡提取液;采用纸片扩散法对样品进行抗菌活性筛选;基于PCR的基因筛选技术探测活性菌株可能存在的NRPS、PKS I、PKS II抗生素生物合成基因。【结果】经形态特征排重,从14种真红树植物样品中共得到放线菌146株,16S rRNA基因序列比对表明它们分布于13个科18个属,其中链霉菌属为优势菌属,菌株S3Cf-2和S3Af-1的16S rRNA基因序列分别与有效发表菌株 *Couchioplanes caeruleus* DSM44103^T (X93202)和 *Microtholunatus terrae* BS6^T (JF806519)的相似率最高,分别为97.45%和97.43%,可能为新物种。对其中46株放线菌发酵样品的抗菌活性检测表明,40株具有抗菌活性,总阳性率为86.96%;活性菌株中,38株菌存在至少一种所探测的生物合成基因簇,阳性率为95%,其中14株同时具有所探测的3种抗生素生物合成基因簇。【结论】海南东寨港真红树植物中存在多样性丰富的药用放线菌资源,具有从中发现放线菌新物种及新抗生素的潜力。

关键词: 红树林, 内生放线菌, 耐药菌, 生物合成基因簇

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 81172963, 81321004, 31260004); National Mega-Project for Innovative Drugs (No. 2012ZX09301-002-001-018).

*Corresponding author: JIANG Rong: E-mail: jr5602@163.com;

SUN Cheng-Hang: Tel: 86-10-63165278; Fax: 86-10-63017302; E-mail: chenghangsun@hotmail.com

Received: September 10, 2015; **Accepted:** November 20, 2015; **Published online** (www.cnki.net): December 03, 2015

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81172963, 81321004, 31260004); 十二五“重大新药创制”科技重大专项项目(No. 2012ZX09301-002-001-018)

*通讯作者: 姜蓉: E-mail: jr5602@163.com

孙承航: Tel: 86-10-63165278; Fax: 86-10-63017302; E-mail: chenghangsun@hotmail.com

收稿日期: 2015-09-10; **接受日期:** 2015-11-20; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-12-03

Diversity and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria isolated from eumangroves collected in Dongzhaigang of Hainan Province

LI Jing¹ DAI Su-Juan¹ TUO Li¹ JIANG Zhong-Ke¹ LIU Shao-Wei^{1,2}
JIANG Ming-Guo² JIANG Rong^{1*} SUN Cheng-Hang^{1*}

(1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

(2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Utilization of Microbial and Botanical Resources, Guangxi University for nationalities, Nanning, Guangxi 530006, China)

Abstract: [Objective] To study the diversity and bioactivity of actinobacteria isolated from Mangroves in Dongzhaigang, Hainan. [Methods] Various tissues from 14 kinds of mangrove plants as samples were collected from Dongzhaigang National Nature Reserve in Hainan, China. Samples were grinded into powders after surface sterilization and cultured on 10 different media for strain isolation. To determine the phylogenetic position of the strains, 16S rRNA gene sequences were obtained by PCR amplification and direct sequencing, then compared with gene database. The antifungal and antibacterial activities of the crude extracts were tested by disk diffusion method. Screening of PKS I, PKS II and NRPS genes was carried out by PCR and agarose electrophoresis. [Results] 146 strains affiliated to 18 genera were obtained. The dominant genus is *Streptomyces*. The highest similarity of 16S rRNA gene sequence between strain S3Cf-2 and the validly described species *Couchioplanes caeruleus* DSM44103^T, between strain S3Af-1 and the validly described species *Microclunatus terrae* BS6^T was 97.45% and 97.43%, respectively, which indicated that the strains S3Cf-2 and S3Af-1 were potential new taxa. The antimicrobial activity of crude extracts from the fermentation broths were tested against different pathogenic microorganisms by paper-disc diffusion method. Antimicrobial test showed that 40 out of 46 strains exhibited positive results in at least one antifungal or antibacterial assay, and the total positive rate was 86.96%. Thirty eight in 40 strains with antimicrobial activity, probably, had at least one antibiotic biosynthetic gene including NRPS, PKS I and PKS II, and 14 strains have all the three kinds of biosynthetic genes of antibiotics. [Conclusion] The study demonstrates that diversity of endophytic actinobacteria from mangrove are rich and mangrove tissues as a special niche for discovery of new pharmaceutical microorganisms are waiting to be explored.

Keywords: Mangrove, Endophytic actinobacteria, Drug resistant bacteria, Biosynthetic gene cluster

植物内生放线菌是指生长在植物的根、茎、叶等组织间隙或细胞内,与植物形成无害关系的一类放线菌,是植物微生态系统中的天然组成成分,也是许多结构新颖天然产物的重要来源^[1]。共进化理论认为,植物内生微生物通过分泌大量结构各异的次级代谢产物来提高对宿主的耐受性^[2]。有研究显示51%从植物内生菌分离的生物活性物质是以前没有发现的化合物,而从土壤微生物发现的新物质仅为38%^[3]。

红树植物分为真红树和半红树,是世界上最特

殊的植物类群之一。真红树植物是指专一性生长在潮间带的木本植物,它们只能在潮间带环境生长繁殖,在陆地环境不能够繁殖^[4]。独特的生态环境赋予了真红树独有的植物特征。

全世界真红树目前有20个科27个属70个种,主要分布在南北回归线之间,按分布的经度可分为东方红树林和西方红树林。我国的红树林隶属东方群系,总共有16个科20个属37个种,主要分布在两广、福建、海南和港澳台等地区^[5]。截止2015年,据本实验室的不完全统计,从我国红树林环境

分离的放线菌已达7个目14个科30个属。近年来,虽然研究人员对红树林生物多样性进行了大量的研究工作,但多数集中在红树林生长的土壤环境,针对红树植物内生放线菌及其抗生素的研究相对较少。为此,我们以海南东寨港红树林国家级自然保护区中14种真红树植物为研究对象,开展红树植物内生放线菌多样性研究及抗菌活性菌株的筛选,以期发现放线菌新物种及尚未在该生态分离到的放线菌类群,为发现新抗生素奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 真红树植物样品: 2014年5月采集海南省东寨港红树林自然保护区的真红树植物样品共14份,详细信息见表1,样品装于35 cm×45 cm规格自封袋中,封口后带回实验室,置于4 °C保存备用。

1.1.2 培养基: (1) 分离培养基: 参考张金丽等^[6]采用的培养基,设计以下10种分离培养基进行菌株分离。A (g/L): 酵母浸膏0.25, K₂HPO₄ 0.50, 琼脂

表1 采集的红树林样品信息
Table 1 Information of mangrove plants

样品 Sample	植物名称 Plant name	采样部位 Type of sample	采样地点 Site information
S1	木榄 <i>Bruguiera gymnorhiza</i>	茎、叶、花、胚轴、树皮	N19°57'02.25"E110°34'34.82"
S2	白骨壤 <i>Avicennia marina</i>	茎、叶	N19°57'01.71"E110°34'35.07"
S3	海莲 <i>Bruguiera sexangula</i>	根、茎、叶、花、树皮	N19°56'59.41"E110°34'32.19"
S4	海桑 <i>Sonneratia caseolaris</i>	茎、叶、树皮、果实	N19°57'02.05"E110°34'34.91"
S5	红海榄 <i>Rhizophora stylosa</i>	根、茎、叶、树皮	N19°57'02.12"E110°34'35.51"
S6	尖瓣海莲 <i>B. sexangula</i> var. <i>rhynchopetala</i>	根、茎、叶、花、树皮	N19°57'01.63"E110°34'35.26"
S7	角果木 <i>Ceriops tagal</i>	根、茎、叶、树皮	N19°57'02.12"E110°34'35.51"
S8	拉关木 <i>Laguncularia racemosa</i>	根、茎、叶、树皮	N19°57'01.88"E110°34'34.93"
S9	老鼠簕 <i>Acanthus ilicifolius</i>	茎、叶、花	N19°57'01.88"E110°34'34.93"
S10	卤蕨 <i>Acrostichum aureum</i>	叶	N19°57'01.88"E110°34'34.93"
S11	美国大红树 <i>Rhizophora mangle</i>	根、茎、叶	N19°57'01.88"E110°34'34.93"
S12	木果楝 <i>Xylocarpus granatum</i>	根、茎、叶、树皮	N19°57'01.82"E110°34'34.96"
S13	桐花树 <i>Parmetiera cerifera</i>	茎、叶、树皮	N19°57'02.02"E110°34'34.96"
S14	阿吉木 <i>Aegialitis annulata</i>	茎、叶	N19°57'00.15"E110°34'32.27"

15, pH 7.2; B (g/L): 腐殖酸1.0, Na_2HPO_4 0.50, KCl 1.71, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, CaCO_3 0.02, 琼脂15.0, pH 7.2; C (g/L): 几丁质2.0, K_2HPO_4 0.7, KH_2PO_4 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, ZnSO_4 0.001, MnCl_2 0.001, 琼脂15.0, pH 7.2; D (g/L): 海藻糖6.0, KNO_3 0.5, Na_2HPO_4 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, CaCl_2 0.3, 琼脂15.0, pH 7.2; E (g/L): 丙酸钠2.0, NH_4NO_3 0.1, KCl 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 琼脂15.0, pH 7.2; F (g/L): 可溶性淀粉2.0, K_2HPO_4 0.5, MgSO_4 0.5, KNO_3 1.0, NaCl 0.4, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 琼脂15.0, pH 7.2; G (g/L): 棉子糖5.0, L-组氨酸1.0, KNO_3 1.0, NaCl 1.0, CaCl_2 2.0, K_2HPO_4 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0, 琼脂15.0, pH 7.2; H (g/L): 琥珀酸钠0.9, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 琼脂15.0, pH 7.2; I (g/L): 柠檬酸0.12, NaNO_3 1.5, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.05, EDTA 0.02, Na_2CO_3 0.2, 琼脂15.0, pH 7.2; J (g/L): 酵母提取物4.0, 麦芽提取物10.0, 葡萄糖4.0, 琼脂15.0, pH 7.2。

(2) 斜面培养基(g/L): 酵母提取物4.0, 麦芽提取物5.0, 葡萄糖4.0, 琼脂15.0, pH 7.2。

(3) 发酵培养基(g/L): 酵母提取物4.0, 麦芽提取物5.0, 葡萄糖4.0, pH 7.2。

(4) 指示菌株培养基: MUELLER-HINTON AGAR (英国OXOID)。

1.1.3 抑制剂(mg/L): 萘啶酮酸25, 重铬酸钾25, 放线菌酮50。

1.1.4 指示菌株: 真菌: 罗伦隐球菌(*Cryptococcus laurentii*) CCTCC91013、白色念珠菌(*Candida albicans*) CCTCC93025购于武汉大学中国典型培养物保藏中心; 革兰氏阳性细菌: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC25923、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)耐药菌2641、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*) ATCC29212、粪肠球菌(*E. faecalis*)耐药菌 ATCC33186; 革兰氏阴性细菌: 鲍曼不动杆菌

(*Acinetobacter baumannii*) ATCC19606、鲍曼不动杆菌(*A. baumannii*)耐药菌2799、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)耐药菌2774、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) ATCC25922、大肠埃希菌(*E. coli*)耐药菌2800、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC10031、肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)耐药菌 ATCC700603均为本所保藏。

1.1.5 主要试剂和仪器: 2×EasyTaq SuperMix、DNA Marker、SYBR Green核酸染料、High Fidelity PCR SuperMix、Trans-T1感受态细胞、pEASY-T1 Cloning Kit均购自北京全式金生物技术有限公司; Chelex100树脂, 美国Bio-Rad公司; Agarose, 美国AndyBio公司; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

超净工作台YT-CJ-IND, 北京亚泰科隆仪器有限公司; 恒温培养箱ZDP-2120和旋转式摇床ZHWHY-211C, 上海智诚分析仪器制造有限公司; 高压蒸汽灭菌锅Autoclave MLS-3750, 日本三洋公司; 小型离心机Centrifuge 1-14, 德国Sigma公司; PCR扩增仪Veriti 96 well fast thermal cycler, 美国Applied Biosystems公司; 电泳仪DYD-6C型, 北京市六一仪器厂; 凝胶成像仪Gel Doc™XR⁺, 美国Bio-Rad公司; 旋转蒸发器OSB-2100, 日本EYELA公司; 显微镜XTS20, 北京福凯仪器有限公司; 96孔板, 美国Corning公司; 粉碎机RT-04, 荣聪精密科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 红树植物样品的处理: 参考黄海玉等^[7]实验方法, 将采集的红树植物样品先用流动的清水冲洗干净, 再超声清洗, 彻底去除植物组织表面的杂质, 把植物样品剪切成5 cm左右长度的节段进行表面消毒。样品依次用1%吐温-20浸泡1 min, 次氯酸钠水溶液(含0.4%有效氯)浸泡8 min, 2.5%硫代硫酸钠浸泡10 min, 75%酒精浸泡7 min, 10%碳酸氢钠浸泡10 min, 每轮浸泡后用无菌水清洗3次。样品晾干后用粉碎机粉碎备用。

1.2.2 菌落分离与保存: 取适量的植物碎片均匀撒在分离培养基表面, 置28 °C培养2–6周。2周之后, 随时观察分离培养基中菌落形态, 并挑取放线菌单菌落进行菌株纯化。纯化菌株分别以斜面4 °C保藏; 同时以20% (体积比)甘油作为保护剂, -80 °C保藏。

1.2.3 基于16S rRNA基因序列的聚类分析: (1) 放线菌16S rRNA基因序列的分子鉴定: 采用Chelex-100法^[8-9]提取放线菌基因组DNA, PCR采用通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')。50 μL PCR反应体系: 2×EasyTaq SuperMix 25 μL, 20 μmol/L 27F 1.5 μL, 20 μmol/L 1492R 1.5 μL, 模板2 μL, 无菌水20 μL。反应条件为: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35个循环; 72 °C 10 min。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测, Bio-Rad凝胶成像仪观察电泳结果。将PCR产物送上海生工生物工程技术有限公司进行纯化并测序。2个潜在新物种菌株S3Af-1和S3Cf-2的PCR扩增产物条带切胶回收, 连接pEASY-T1克隆载体后, 转化至Trans-T1感受态细胞中, 挑取阳性克隆子, 用PCR法验证克隆的片段大小并送上海生工生物工程技术有限公司测序。(2) 序列分析和系统发育树构建: 所测序列在EzBioCloud等公共数据库中进行相似性搜索, 调出相似性最高且为有效发表的典型菌株的序列, 用BioEdit^[10]软件进行序列比对, 采用MEGA 5.0^[11]软件以邻接法(Neighbor-Joining)^[12]进行聚类分析并构建系统发育树, 系统进化矩阵根据Kimura two parameter模型评估, 重复取样1 000次进行自展值分析, 评估进化树拓扑结构的稳定性。

1.2.4 活性测定: (1) 发酵与提取: 将斜面上生长良好的放线菌接种于装有100 mL发酵培养基的500 mL三角瓶中, 28 °C、180 r/min培养7 d。发酵液4 500 r/min离心20 min获得上清液与菌体, 上清液留存2 mL; 剩余上清液用等体积乙酸乙酯萃取, 获得的酯相浓缩干燥后, 用3 mL甲醇溶解留存备

用; 水层留存50 mL, 浓缩干燥后用3 mL甲醇水溶液溶解留存备用; 菌体丙酮浸泡24 h, 过滤获浸泡液, 浸泡液挥干后用3 mL甲醇溶解留存备用。(2) 抗菌活性的测定: 吸取上述制备的四类样品各60 μL置于直径为6 mm的圆形无菌滤纸片上, 待甲醇挥发干后, 贴于含有指示菌株的培养基上, 37 °C培养24 h, 观察并记录抑菌圈大小。

1.2.5 抗生素生物合成基因(NRPS、PKS I 和 PKS II)的探测: 基因组DNA的提取方法见1.2.3, 采用PCR扩增非核糖体多肽合成酶(NRPS)基因A结构域(引物A3F: 5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSG G-3'; A7R: 5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3')^[13]的反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 0.5 min, 59 °C 2 min, 72 °C 4 min, 35个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保持。扩增I型聚酮合酶(PKS I)基因KS结构域(引物K1F: 5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'; M6R: 5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3')^[14]的反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 0.5 min, 59 °C 2 min, 72 °C 4 min, 35个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保持。扩增II型聚酮合酶(PKS II)基因KS结构域(引物KSα: 5'-TSGCSTGCTTGGAYGCSATC-3'; KSβ: 5'-TGGAANCCGCCGAABCCTCT-3')^[14]的反应条件: 96 °C 2 min; 96 °C 1 min, 60 °C 2 min, 73 °C 1.5 min, 35个循环; 72 °C 8.5 min; 4 °C 保持。产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测, Bio-Rad凝胶成像仪观察结果。

2 结果与分析

2.1 放线菌多样性

采用10种分离培养基, 从14份真红树植物样品中共分离得到菌株215株。基于形态特征排重和16S rRNA基因序列分析, 获得放线菌菌株146株(表2), 它们分布于8个目13个科18个属, 包括链霉菌属(*Streptomyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、戈登氏菌属(*Gordonia*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)、

科氏游动菌属(*Couchioplanes*)、隐孢囊菌属(*Cryptosporangium*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、小月菌属(*Microlunatus*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiosis*)、野野村氏菌属(*Nonomuraea*)、游动放线菌属(*Actinoplanes*)、植物栖居菌属(*Phytohabitans*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)和继生菌属(*Jishengella*), 其中链霉菌属(*Streptomyces*)为优势菌属。146株放线菌多样性分布见图1, 菌株S3Af-1与最近的有效发表菌株*M. terrae* BS6^T (JF806519)相似率为97.43%。以16S rRNA基因序列为基础, 采用邻接法(Neighbour-Joining, NJ)构建的系统发育树中, 菌株S3Af-1与小月菌属(*Microlunatus*)有效

发表菌株*M. terrae* BS6^T和*Microlunatus* Soil CC-12602^T聚为一簇并形成一个独立的分支, 结果如图2所示。菌株S3Cf-2与有效发表菌株*C. caeruleus* DSM44103^T(X93202)相似率为97.45%, 与*Krasilnikovia cinnamomea* 3-54/41^T (AB236956)、*Phytohabitans suffuscus* K07-0523^T(AB490769)、*Phytohabitans rumicis* K11-0047^T (AB663559)、*Pseudosporangium ferrugineum* 3-44-a-19^T (AB302183)和*Actinoplanes globisporus* JCM3186^T(AB048219)相似率分别为97.36%、96.97%、96.91%、96.88%和96.88%, 但采用邻接法(Neighbour-Joining, NJ)、最大似然法(Maximum-Likelihood, ML)和最大简约法

表2 146株放线菌的多样性分布情况
Table 2 Biodiversity and distribution of 146 strains

目 Order	科 Family	属 Genus	菌株数量 Number of strains
链霉菌目 Streptomycetales	链霉菌科 Streptomycetaceae	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	65
棒杆菌目 Corynebacteriales	诺卡氏菌科 Nocardiaceae	戈登氏菌属 <i>Gordonia</i>	30
	迪茨氏菌科 Dietziaceae	迪茨氏菌属 <i>Dietzia</i>	1
微球菌目 Micrococcales	微杆菌科 Microbacteriaceae	微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	18
	纤维单孢菌科 Cellulomonadaceae	纤维单孢菌属 <i>Cellulomonas</i>	10
	原小单孢菌科 Promicromonosporaceae	纤维微菌属 <i>Cellulosimicrobium</i>	1
	微球菌科 Micrococcaceae	考克氏菌属 <i>Kocuria</i>	1
假诺卡氏菌目 Pseudonocardiales	假诺卡氏菌科 Pseudonocardiaceae	拟无枝菌酸菌属 <i>Amycolatopsis</i>	7
		糖多孢菌属 <i>Saccharopolyspora</i>	1
弗兰克氏菌目 Frankiales	隐孢囊菌科 Cryptosporangiaceae	隐孢囊菌属 <i>Cryptosporangium</i>	3
链孢囊菌目 Streptosporangiales	拟诺卡氏菌科 Nocardiosporaceae	拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiosis</i>	2
	链孢囊菌科 Streptosporangiaceae	野野村氏菌属 <i>Nonomuraea</i>	1
小单孢菌目 Micromonosporales	小单孢菌科 Micromonosporaceae	库奇游动菌属 <i>Couchioplanes</i>	1
		继生菌属 <i>Jishengella</i>	1
		小单孢菌属 <i>Micromonospora</i>	1
		植物栖居菌属 <i>Phytohabitans</i>	1
		游动放线菌属 <i>Actinoplanes</i>	1
丙酸杆菌目 Propionibacteriales	丙酸杆菌科 Propionibacteriaceae	小月菌属 <i>Microlunatus</i>	1

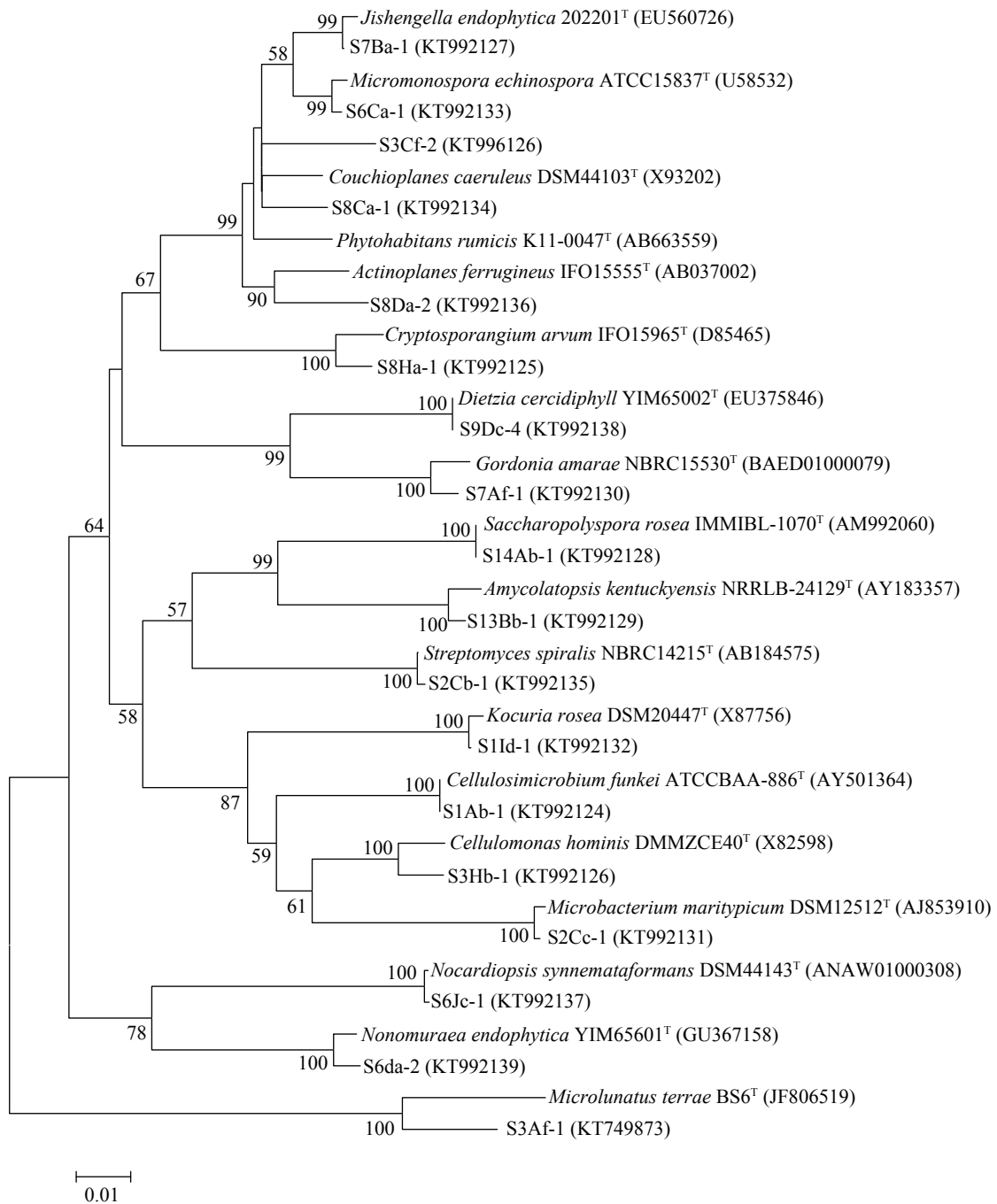


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的部分代表性分离菌株与相近种之间的系统进化树

Figure 1 Neighbour-joining phylogenetic tree based on almost complete 16S rRNA gene sequence, showing the relationships among representative strains and their closely related type strains

注: 括号内为模式菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 标尺或刻度 0.01 代表 1% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those type strains. The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications). The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position with their 16S rRNA gene sequences.

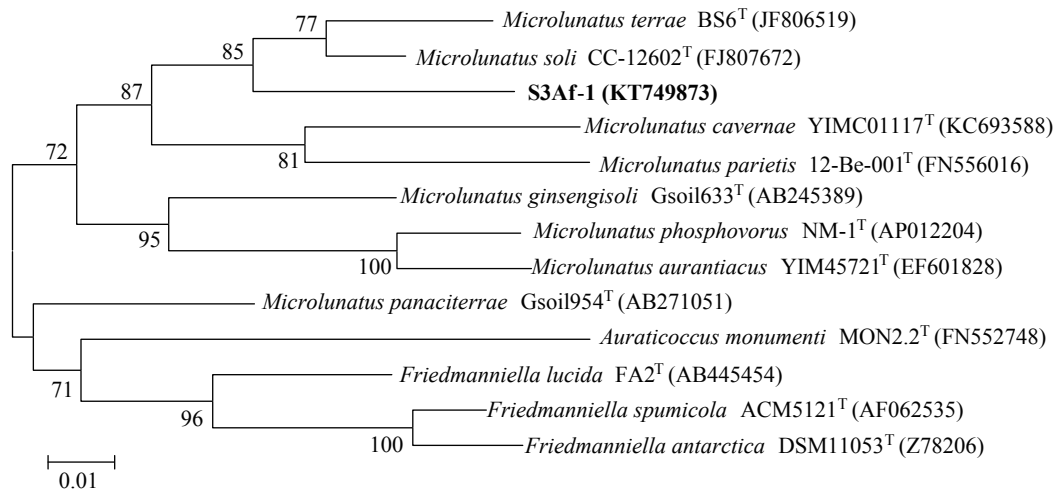


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 S3Af-1 与丙酸杆菌科菌株的 N-J 系统进化树

Figure 2 Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic relationships between strain S3Af-1 and representatives of family Propionibacteriaceae based on 16S rRNA gene sequences

注: 括号内为模式菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 标尺或刻度 0.01 代表 1% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those type strains. The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications). The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position with their 16S rRNA gene sequences.

(Maximum-Parsimony, MP)构建的系统进化树中(图 3), 菌株 S3Cf-2 不与这 6 个有效发表菌株中任何一个单独相聚, 而是形成了一个独立分支。因此推测菌株 S3Af-1 为丙酸杆菌科小月菌属的潜在新种, 菌株 S3Cf-2 为小单孢菌科中的一个潜在新属, 两株放线菌多相分类研究将另文发表。

2.2 146 株放线菌在培养基及植物样品中的分布

培养基 A-J (见 1.1.2 培养基)和植物样品中放线菌出菌数分别见图 4 和图 5, 其中 H 培养基分离到的放线菌株最多为 27 株, 其次是 A 培养基 23 株。在 14 份样品中, S3 样品海莲分离到的放线菌菌株最多为 33 株。

2.3 抗菌活性筛选结果

2.3.1 46 株放线菌抗菌活性评价: 146 株放线菌经 16S rRNA 基因序列鉴定分布于 18 个属, 根据菌落形态特征及 16S rRNA 基因序列相似率, 每个菌属选取部分代表菌株, 共 46 株放线菌, 对其发酵液提取物进行抗菌活性筛选, 有 40 株菌检测到至少有一种抗菌活性, 总阳性率为 86.96%。四类样品中

阳性菌株数统计结果(图 6)显示, 样品中共 13 株具有抗真菌活性, 40 株有抗革兰氏阳性细菌活性, 23 株有抗革兰氏阴性细菌活性。特别值得关注的是, 筛选到了对产 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌有抑制活性的菌株 6 株, 对临床耐药的鲍曼不动杆菌具有抑制活性的菌株 12 株, 这些研究结果为抗耐药菌抗生素的发现奠定了基础。

2.3.2 潜在新物种菌株 S3Cf-2 和 S3Af-1 的活性评价:

抗菌活性检测结果(表 3)表明, 菌株 S3Cf-2 乙酸乙酯提取液对革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌和粪肠球菌)、革兰氏阴性菌(大肠杆菌和肺炎克雷伯菌)及真菌(白色念珠菌和罗伦隐球菌)等均有活性。其中对金黄色葡萄球菌活性最强, 抑菌圈直径达 28 mm。对耐氨基糖苷类的粪肠球菌也有一定活性, 抑菌圈直径达 17 mm。菌株 S3Af-1 水层样品对革兰氏阴性菌肺炎克雷伯菌及真菌白色念珠菌均有一定活性。

2.4 NRPS、PKS I 和 PKS II 基因的筛选结果

对 40 株具有抗菌活性的放线菌开展 NRPS、

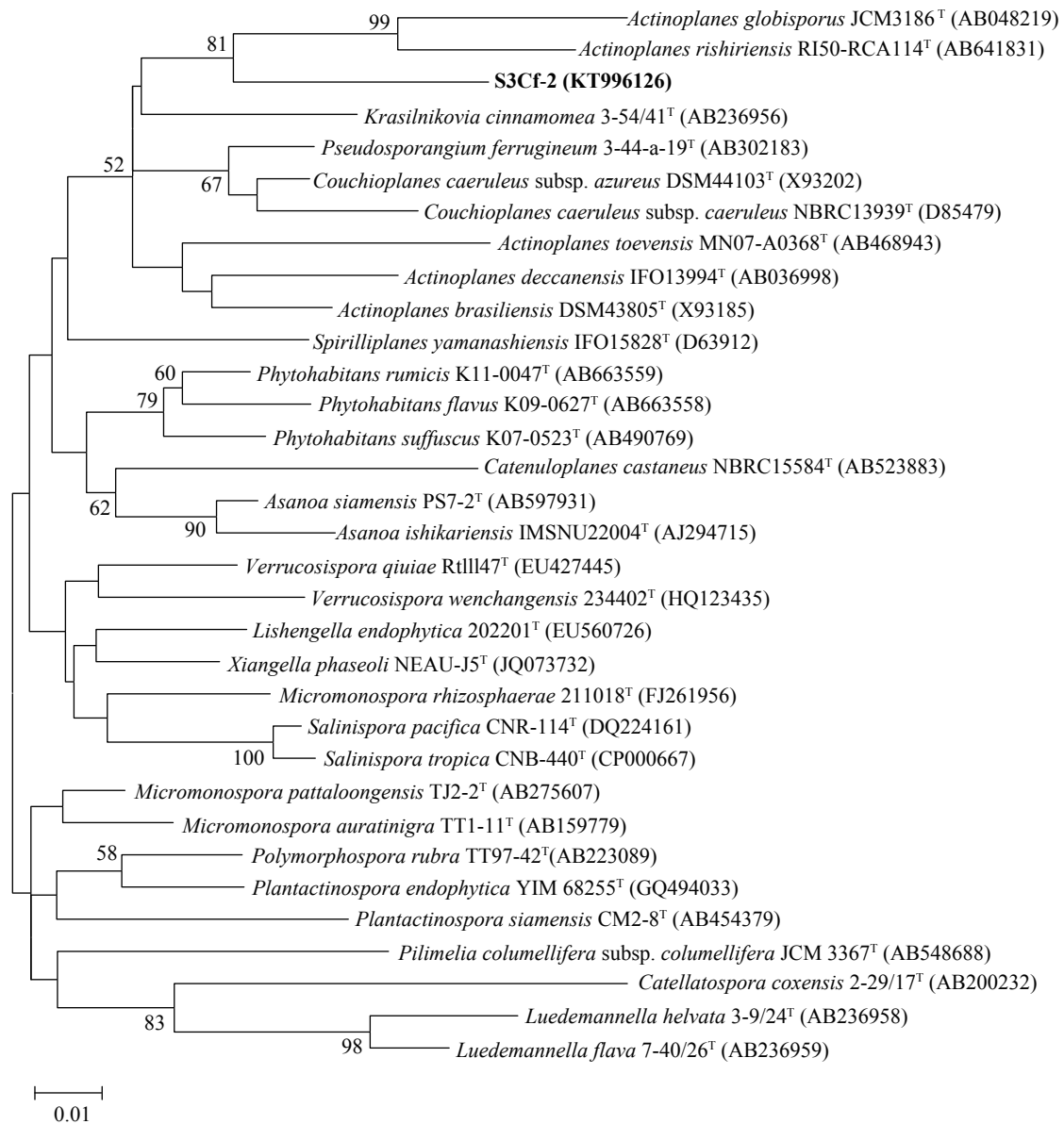


图3 基于16S rRNA基因序列构建的菌株S3Cf-2与小单孢菌科菌株的N-J系统进化树

Figure 3 Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic relationships between strain S3Cf-2 and representatives of family Micromonosporaceae based on 16S rRNA gene sequences

注: 括号内为模式菌株的16S rRNA基因序列在GenBank中的登录号; 分支点上的数字表示构建系统树时1000次计算时形成该节点的百分比; 标尺或刻度0.01代表1%的16S rRNA基因序列的进化差异。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those type strains. The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 1000 replications). The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position with their 16S rRNA gene sequences.

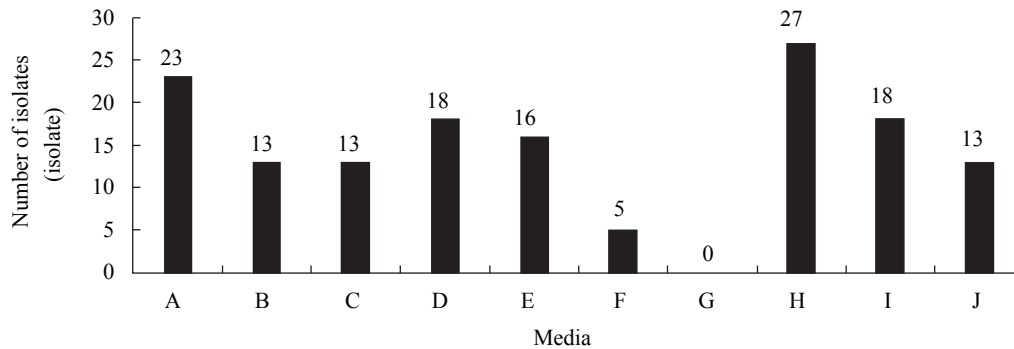


图4 不同培养基分离到的放线菌数量
Figure 4 The amount of isolates from different media

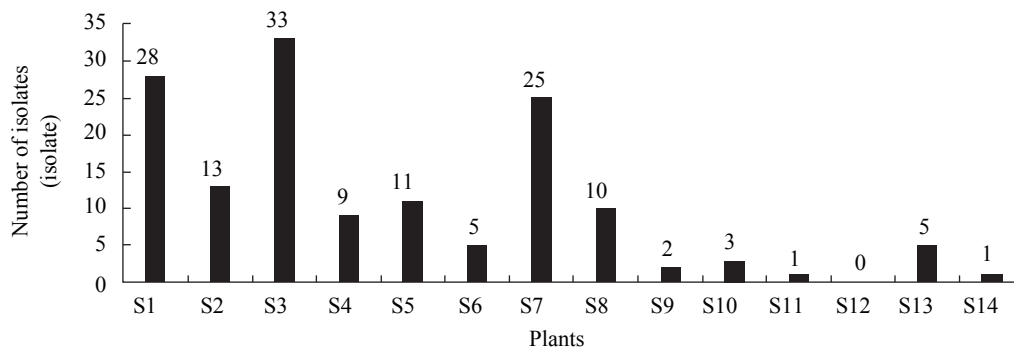


图5 不同样品分离到的放线菌数量
Figure 5 The amount of isolates from different samples

注: S1: 木榄; S2: 白骨壤; S3: 海莲; S4: 海桑; S5: 红海榄; S6: 尖瓣海莲; S7: 角果木; S8: 拉关木; S9: 老鼠簕; S10: 卤蕨; S11: 美国大红树; S12: 木果楝; S13: 桐花树; S14: 阿吉木。

Note: S1: *Bruguiera gymnorhiza*; S2: *Avicennia marina*; S3: *Bruguiera sexangula*; S4: *Sonneratia caseolaris*; S5: *Rhizophora stylosa*; S6: *B. sexangula* var. *rhynchopetala*; S7: *Ceriops tagal*; S8: *Laguncularia racemosa*; S9: *Acanthus ilicifolius*; S10: *Acrostichum aureum*; S11: *Rhizophora mangle*; S12: *Xylocarpus granatum*; S13: *Parmentiera cerifera*; S14: *Aegialitis annulata*.

PKS I 和 PKS II 生物合成基因的探测。3 对引物扩增后的目的基因片段长度各不相同(图 7), NRPS 基因 PCR 扩增片段长度在 700–800 bp, PKS I 基因 PCR 扩增片段长度在 1 200–1 400 bp, PKS II 基因 PCR 扩增片段长度在 600 bp 左右^[15]。结果表明 38 株含有至少一种生物合成基因, 总阳性率为 95.00%。其中, NRPS 基因阳性率最高, 为 37 株, PKS I 基因 17 株, PKS II 基因 31 株, 3 种生物合成基因簇均为阳性的菌株 14 株(图 8)。

3 讨论

海南东寨港红树林保护区是我国建立的第一个红树林保护区, 位于海南省海口市境内, 即琼山县

的三江、演丰、演海和文昌县的铺前、罗豆的交界处^[16]。中国原分布真红树植物种类 24 种、半红树植物 12 种, 东寨港现分别有 23 种和 12 种, 占据了全国红树植物种类的 97%。本研究采集的真红树植物共 14 种, 分离到 146 株放线菌, 分布在 18 个属中, 其中纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、库奇游动菌属(*Couchioplanes*)、隐孢囊菌属(*Cryptosporangium*)、小月菌属(*Microplanus*)、植物栖居菌属(*Phytohabitans*)和游动放线菌属(*Actinoplanes*)作为红树植物内生放线菌较为少见。46 株放线菌发酵样品的抗菌活性检测表明, 40 株具有抗菌活性, 总阳性率为 86.96%; 活性菌株中,

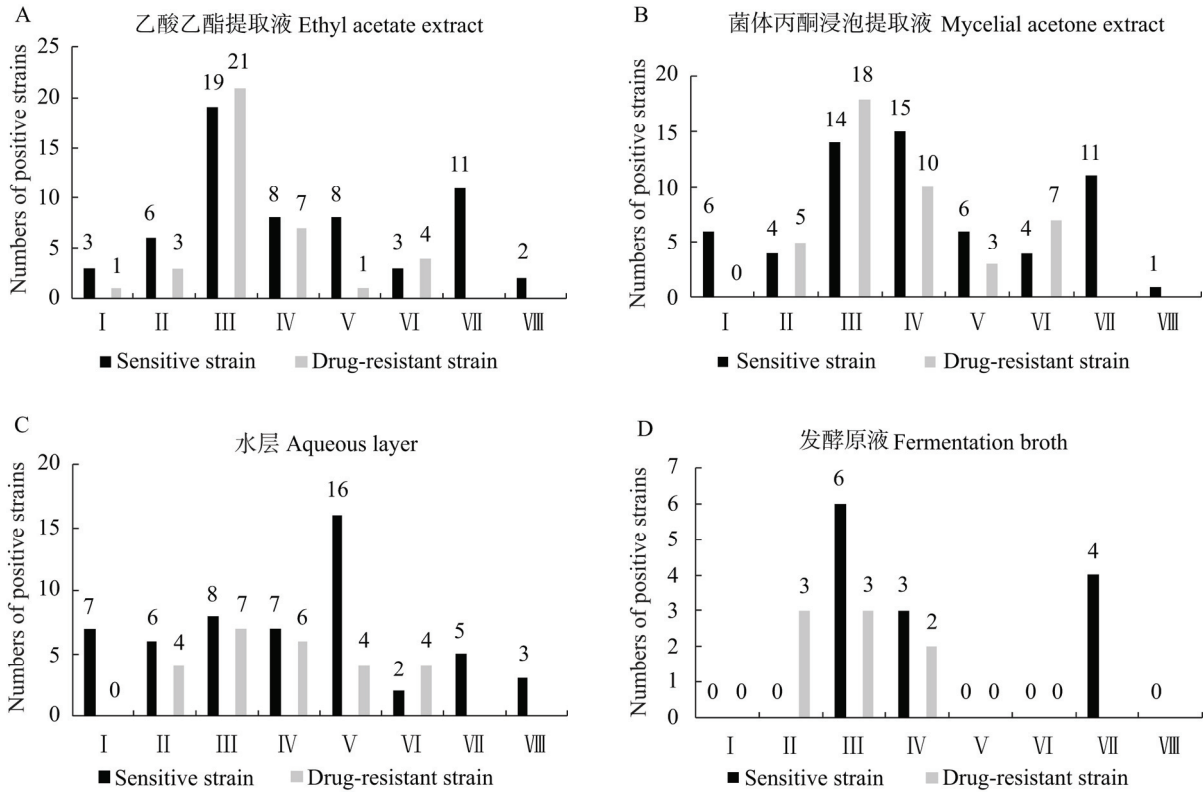


图 6 具有抗菌活性的阳性菌株数

Figure 6 Positive strains with antifungal and/or antibacterial activity

注: I: 铜绿假单胞菌; II: 大肠埃希菌; III: 金黄色葡萄球菌; IV: 粪肠球菌; V: 肺炎克雷伯菌; VI: 鲍曼不动杆菌; VII: 白色念珠菌; VIII: 罗伦隐球菌。

Note: I: *Pseudomonas aeruginosa*; II: *Escherichia coli*; III: *Staphylococcus aureus*; IV: *Enterococcus faecalis*; V: *Klebsiella pneumoniae*; VI: *Acinetobacter baumannii*; VII: *Candida albicans*; VIII: *Cryptococcus laurentii*.

表 3 菌株 S3Cf-2 及 S3Af-1 抗菌活性
Table 3 Antibacterial activity of S3Cf-2 and S3Af-1

菌株编号 Code for strains	样品种类 Sample types	I		II		III		IV		V		VI		VII	VIII
		S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S		
S3Cf-2	E	-	-	15	-	28	-	18	17	9	-	-	-	13	±
	M	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	10	-
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S3Af-1	E	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-	8	-
	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: I: 铜绿假单胞菌; II: 大肠埃希菌; III: 金黄色葡萄球菌; IV: 粪肠球菌; V: 肺炎克雷伯菌; VI: 鲍曼不动杆菌; VII: 白色念珠菌; VIII: 罗伦隐球菌; E: 乙酸乙酯提取液; M: 菌体丙酮浸泡提取液; A: 水层; B: 发酵原液; S: 敏感菌株; R: 耐药菌株; ±: 弱活性; -: 无活性; 数值: 抑菌圈直径(mm)。

Note: I: *Pseudomonas aeruginosa*; II: *Escherichia coli*; III: *Staphylococcus aureus*; IV: *Enterococcus faecalis*; V: *Klebsiella pneumoniae*; VI: *Acinetobacter baumannii*; VII: *Candida albicans*; VIII: *Cryptococcus laurentii*; E: Ethyl acetate extract; M: Mycelial acetone extract; A: Aqueous layer; B: Fermentation broth; S: Sensitive strain; R: Drug-resistant strain; ±: Weak; -: Negative; Numbers: Diameter of transparent zone (mm) of inhibitory activity.

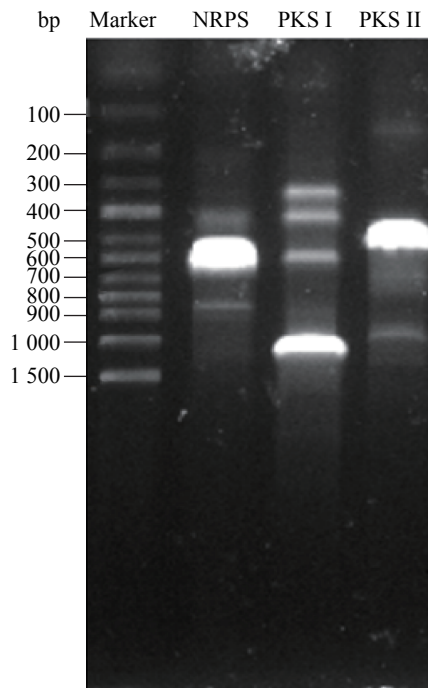


图7 NRPS、PKS I 和 PKS II 基因电泳图
Figure 7 PCR products of NRPS, PKS I and PKS II gene by agarose electrophoresis

38 株菌存在至少一种所探测的生物合成基因簇,阳性率为 95%, 其中 14 株同时具有所探测的 3 种抗生素生物合成基因簇。潜在新物种 S3Cf-2 及 S3Af-1 菌株均分离自海莲树皮, 分离培养基分别为 C 培养基和 A 培养基。菌株 S3Cf-2 和菌株 S3Af-1 均有一

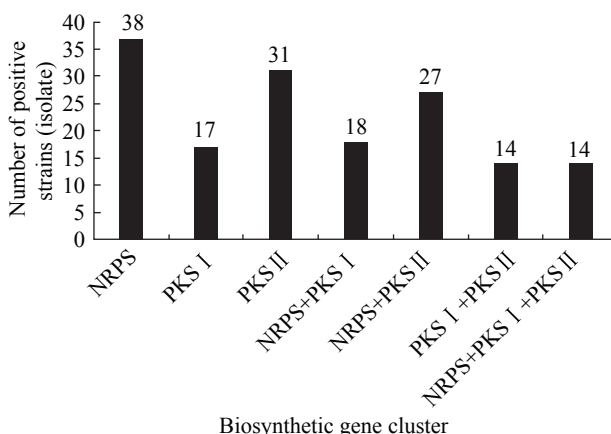


图8 NRPS、PKS I 和 PKS II 基因的筛选结果
Figure 8 Results of NRPS, PKS I and PKS II gene screening

定抗菌活性, 对两株菌进行 NRPS、PKS I 和 PKS II 生物合成基因探测, 结果表明菌株 S3Cf-2 含有全部 3 种生物合成基因簇, 而菌株 S3Af-1 含有 NRPS 和 PKS II 两种生物合成基因簇, 对这两株潜在放线菌新物种产生的抗菌活性成分的研究正在进行中。本研究结果表明, 海南东寨港真红树植物中存在多样性丰富的药用放线菌资源, 具有从中发现放线菌新物种及新抗生素的潜力。

致谢: 样品采集和论文撰写得到海南东寨港国家级自然保护区管理局钟才荣高级工程师的大力协助。

参 考 文 献

- [1] Lin C. Study on the isolation, identification, bioactivity and secondary metabolites of mangrove actinomycetes[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2009 (in Chinese)
林诚. 红树植物内生放线菌的分离、活性筛选和次级代谢产物研究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2009
- [2] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products[J]. *Microbes and Infection*, 2003, 5(6): 535-544
- [3] Schulz B, Boyle C, Draeger S, et al. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites[J]. *Mycological Research*, 2002, 106(5): 996-1004
- [4] Lin P, Fu Q. Environmental Ecology and Economic Utilization of Mangroves in China[M]. Beijing: Higher Education Press, 1995 (in Chinese)
林鹏, 傅勤. 中国红树林环境生态及经济利用[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995
- [5] Zhao YJ. The isolation and identification of actinomycetes and an exiguobacterium from the mangrove rhizosphere soil in Beihai[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University for Nationalities, 2013 (in Chinese)
赵艳娟. 北海红树林根际土壤放线菌及一株微小杆菌的分离与鉴定[D]. 南宁: 广西民族大学硕士学位论文, 2013
- [6] Zhang JL, Qin YL, Xiong ZJ, et al. The selective isolation of endophytic actinomycetes[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(7): 1305-1313 (in Chinese)
张金丽, 秦玉丽, 熊子君, 等. 植物内生放线菌的选择性分离[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(7): 1305-1313
- [7] Huang HY, Li J, Zhao GZ, et al. Diversity and antimicrobial activities of endophytic actinomycetes isolated from *Alstonia scholaris*[J]. *Microbiology China*, 2011, 38(5): 780-785 (in Chinese)
黄海玉, 李洁, 赵国振, 等. 灯台树内生放线菌多样性及抗菌活性评价[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(5): 780-785
- [8] Zhang YQ, Li WJ, Chen GZ, et al. Comparison of five PCR template preparation methods for fast identification of *Actinobacteria*[J]. *Biotechnology*, 2004, 14(5): 37-39 (in Chinese)
张玉琴, 李文均, 陈国忠, 等. PCR 法快速识别 *Actinobacteria* 的五种模板制备方法的比较[J]. *生物技术*, 2004, 14(5): 37-39
- [9] Zhou SQ, Huang XL, Huang DY, et al. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010, (2): 123-125 (in Chinese)
周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. *生物技术通报*, 2010, (2):

- 123-125
- [10] Hall TA. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599
- [12] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425
- [13] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR Primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups[J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 10-24
- [14] Metsä-Ketelä M, Salo V, Halo L, et al. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 180(1): 1-6
- [15] Qi FF. Isolation and functional gene screening for mangrove actinomycetes[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2011 (in Chinese)
齐芳芳. 红树林放线菌的分离及其功能基因筛选[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2011
- [16] Xiao SB, Nan Y. Dongzhai, China's first protected area of mangroves[J]. *Human & Nature*, 2013(8): 80-89 (in Chinese)
肖诗白, 南野. 东寨港, 中国第一个红树林保护区[J]. *人与自然*, 2013(8): 80-89

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、显微世界、专栏、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 参考文献

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过3人时全部列出, 多于3人时列出前3人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. *Electrophoresis*, 1991, 12(5): 376-377

Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)

王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(1): 6-17

Shen T, Wang JY. *Biochemistry*[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)

沈同, 王镜岩. *生物化学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87

Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)

刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-00-00; 接受日期: 20xx-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-00-00

(下转 p.1784)