

研究报告

广西北部湾茅尾海红树林生境放线菌分离培养基的比较

石松标¹ 杨立芳¹ 姜明国^{2*} 张坤³ 姜龙芊³ 李桂鼎^{3,4} 姜怡^{3*}

(1. 广西民族大学化学化工学院 广西 南宁 530008)

(2. 广西民族大学海洋与生物技术学院 广西高校微生物与植物资源利用重点实验室 广西 南宁 530008)

(3. 云南大学云南省微生物研究所 云南 昆明 650091)

(4. 东北大学微生物药物研究所 辽宁 沈阳 110819)

摘要:【背景】红树林生境拥有丰富的微生物资源, 分离获得更多的纯培养放线菌为新型抗生素的发现提供菌种资源。【目的】使用新型放线菌分离培养基, 发掘广西北部湾茅尾海红树林生境放线菌资源, 评估新型放线菌分离培养基分离效果。【方法】设计出新型放线菌分离培养基——椰子汁-海藻糖培养基, 对广西北部湾茅尾海红树林根际土壤和红树林根皮放线菌进行分离。基于分子生物学鉴定方法, 对获得的纯培养放线菌进行多样性分析。【结果】从红树林根际土壤样品中分离获得 65 株放线菌, 分布在 5 个目 10 个科 15 个属, 使用 YIM171 培养基分离到 7 个属, MA 培养基分离到 5 个属, 椰子汁-海藻糖培养基分离到 11 个属, 其中包括 4 株潜在新种; 从红树林根皮样品中分离获得 19 株放线菌, 分布在 4 个目 7 个科 10 个属, 使用 YIM171 和椰子汁-海藻糖培养基分别分离到 7 个属, 包括 4 株潜在新种; 使用椰子汁-海藻糖培养基在红树林生境两类样品中获得 3 株潜在新种。【结论】广西北部湾茅尾海红树林根际土壤和根皮中放线菌多样性丰富, 使用椰子汁-海藻糖培养基分离放线菌效果较佳, 可用作放线菌的分离培养基。

关键词: 红树林生境, 放线菌, 分离培养基, 多样性, 广西北部湾

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31660005, 31260004, 31460005); Scientific and Technological Breakthrough Program of Nanning City (20153330); Science and Technology Base and Talent Special Project of Guangxi Province (2017AD19029); Innovation Project of Guangxi Graduate Education (2017123)

*Corresponding authors: JIANG Ming-Guo: Tel: 86-771-3267023; E-mail: mzxyjiang@163.com
JIANG Yi: Tel: 86-871-65034073; E-mail: jiangyi@ynu.edu.cn

Received: May 14, 2018; **Accepted:** August 28, 2018; **Published online** (www.cnki.net): September 11, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31660005, 31260004, 31460005); 南宁市科技攻关项目(20153330); 广西科技基地与人才专项(2017AD19029); 广西研究生教育创新计划(2017123)

*通信作者: 姜明国: Tel: 86-771-3267023; E-mail: mzxyjiang@163.com

姜怡: Tel: 86-871-65034073; E-mail: jiangyi@ynu.edu.cn

收稿日期: 2018-05-14; 接受日期: 2018-08-28; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-09-11

A comparison of actinomycetes isolation medium with samples from mangrove habitats in Maowei Sea, Guangxi Beibu Gulf

SHI Song-Biao¹ YANG Li-Fang¹ JIANG Ming-Guo^{2*} ZHANG Kun³ JIANG Long-Qian³
LI Gui-Ding^{3,4} JIANG Yi^{3*}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University for Nationalities, Nanning, Guangxi 530008, China)

(2. College of Marine Biotechnology, Guangxi Key Laboratory of Utilization of Microbial and Botanical Resources, Guangxi University for Nationalities, Nanning, Guangxi 530008, China)

(3. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(4. Institute of Microbial Pharmaceuticals, Northeastern University, Shenyang, Liaoning 110819, China)

Abstract: [Background] Mangrove habitats are rich in microbial resources. Isolation of more pure culture actinomycetes can provide strain resources for the discovery of new antibiotics. [Objective] A new actinomycete isolation medium was used to explore the strain resources of actinomycetes in mangrove habitats of Maowei Sea in Guangxi Beibu Gulf. Separation effect of new actinomycetes isolated culture medium was evaluated. [Methods] Coconut juice-mycose medium was newly designed and used for isolating actinobacteria from mangrove rhizosphere soil and mangrove root bark in Guangxi Beibu Gulf, Maowei Sea. The diversity analysis of pure culture actinomycetes was carried out based on molecular biology method. [Results] 65 strains of actinomycetes, including 4 potential new taxa, were isolated from the rhizosphere soil of mangrove which distributed in 5 orders, 10 families and 15 genera. Seven, five and eleven genera were isolated by YIM171, MA and coconut juice-mycose medium respectively. 19 strains of actinomycetes, including 4 potential new taxa, isolated from the root bark of mangrove were distributed in 4 orders, 7 families and 10 genera, 7 genera were isolated by YIM171 medium and coconut juice-mycose medium, respectively. Three potential new taxa were obtained from two kinds of samples in mangrove habitats using Coconut juice-mycose medium. [Conclusion] Rhizosphere soil and root bark of mangrove in Guangxi Beibu Gulf, Maowei Sea present an extremely abundant habitats for the isolation of a significant diversity of actinomycetes. Coconut juice-mycose medium is effective in the isolation of actinomycetes thus can be considered as the isolation medium for actinomycetes.

Keywords: Mangrove habitat, Actinomycete, Isolation medium, Diversity, Guangxi Beibu Gulf

随着新传染病和抗生素耐药性的不断出现, 亟待发现新型微生物药物^[1]。放线菌是一类高G+C%含量的革兰氏阳性细菌, 从1943年Waksman发现链霉素以后, 已从放线菌次级代谢产物中发现了大量抗生素^[2]。微生物中大约40%的抗生素和38%的生物活性物质来自放线菌的次级代谢产物^[3-4]。放线菌的次级代谢产物迄今仍是发掘新生物活性物质的重要来源^[5]。根据新物种-新基因-新化合物的特点, 为了发现新药物, 挖掘新的放线菌资源是首要解决的问题。分子生物学方法研究结果表明, 大约99%的微生物未能在实验室条件下分离鉴定, 其主要原因还是受分离条件和技术的限制^[6]。红树林生境是沿海地区潮间

带海岸特有的木本植物群落, 因受到周期性潮水影响, 可利用的营养物质变化大, 蕴藏着丰富而独特的微生物资源^[7-8]。已有研究表明, 从红树林生境分离到了丰富多样的放线菌菌株^[9-11], 一些菌株能产生具有抗菌、抗肿瘤、抗氧化活性的次级代谢产物^[12-14]。广西北部湾茅尾海拥有丰富的红树林生态资源^[15], 挖掘红树林生境中的放线菌对于海洋资源的开发具有重要意义。本实验设计出分离放线菌的新型椰子汁-海藻糖培养基(YIM91), 对广西北部湾茅尾海红树林生境中放线菌进行分离, 并对获得的纯培养放线菌进行多样性分析, 评价新设计的放线菌分离培养基的分离效果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品信息

从广西北部湾茅尾海(21°51'40.31"–21°52'20.98"N, 108°34'09.15"–108°32'55.17"E)采集 14 份红树林根际土壤样品和 5 份红树植物根皮, 保存在无菌密封袋中, 放置于冰盒中带回实验室。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌通用引物 PA、PB 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 溶菌酶、蛋白酶、dNTPs、*Taq* 酶、Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司。电泳仪购自 Bio-Rad 公司; PCR 仪购自 Biometra 公司; 超声波清洗器购自上海科导超声仪器公司。

1.2 方 法

1.2.1 分离培养基

本实验室 YIM171 培养基^[16]分离放线菌多样性好, 是常用放线菌分离培养基。Marine agar (MA) 为分离海洋放线菌经典培养基, 用于海洋环境各种样品中放线菌的分离。YIM91 培养基为新设计的放线菌分离培养基, 用于分离各种样品中的放线菌。实验使用 YIM171、MA 和 YIM91 三种放线菌分离培养基对红树林根际土壤放线菌进行分离, 使用 YIM171 培养基和 YIM91 培养基对红树根皮放线菌进行分离, 以研究北部湾茅尾海红树林生境放线菌多样性, 并对 YIM91 培养基分离效果进行评价。

椰子汁-海藻糖培养基(g/L): 豚蛋白胨 1.0, 酵母提取粉 0.5, 半胱氨酸 1.0, 海藻糖 1.0, NaHCO₃ 4.0, K₂HPO₄ 0.45, KH₂PO₄ 0.45, NaCl 0.9, MgSO₄·7H₂O 0.09, CaCl₂ 0.09, 氯化血红素 0.01, 生物素 0.01 mg, 海盐 25.0, 新鲜椰子汁 10 mL, 琼脂 15.0, pH 7.2。抑制剂: 萘啶酸 25 mg/L, 制霉菌素 100 mg/L。

YIM171 (g/L): 甘油 10.0, 天冬酰胺 1.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, CaCO₃ 0.3, 复合维生素 0.03, 微量盐溶液(FeSO₄·7H₂O 0.1 g, MnCl₂·4H₂O 0.1 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, 溶于 100 mL 水) 1.0 mL, 海盐 25.0, 琼脂 15.0, pH 7.2–7.4。抑制剂: 重铬酸钾

50 mg/L, 萘啶酸 25 mg/L。

Marine agar (MA)培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 酵母粉 1.0, 柠檬酸铁 0.1, NaCl 19.45, MgCl₂ 8.80, Na₂SO₄ 3.24, CaCl₂ 1.8, KCl 0.55, NaHCO₃ 0.16, KBr 0.08, SrCl₂ 0.034, 硼酸 0.022, 硅酸钠 0.004, 氟化钠 0.002 4, 硝酸铵 0.001 6, 磷酸钠 0.008, 海盐 25.0, 琼脂 15.0, pH 7.2–7.4。

1.2.2 样品处理

土壤样品处理^[17]: 将 14 份土壤样品置于无菌培养皿中, 28 °C 风干 1 周, 磨成粉末。称取 2.0 g, 80 °C 干热处理 1 h 后加入到 18 mL 无菌 0.1% Na₄P₂O₇ 溶液中, 180 r/min 振摇 1 h 得到土壤样品悬液。土壤样品悬液在超声清洗器中振荡处理 40 s, 取 1 mL 悬液加入到 9 mL 无菌 0.1% Na₄P₂O₇ 溶液稀释 2 次, 得到浓度为 10⁻²、10⁻³ 稀释液, 取 200 μL 涂布于分离平板上。

红树植物样品^[18]: 称取红树根皮 2.0 g, 用无菌水冲洗 2 次, 置于无菌管中, 8 000 r/min 匀浆 5 min, 将匀浆液加入到无菌 0.1% Na₄P₂O₇ 溶液中得到浓度为 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 的稀释液, 取 200 μL 涂布于分离平板上。

1.2.3 菌株的分离、纯化培养及保藏

将涂布好的平板于 28 °C 倒置培养 2–4 周, 根据生理形态特点, 用竹签将单菌落挑取在 ISP2 斜面上, 在 28 °C 培养 7–10 d, 去除重复和污染菌株后编号。将菌株接在平板上纯化, 确定为纯菌后, 转入斜面 4 °C 短期保存, 转入甘油管(20%, 体积比) –20 °C 长期保存。

1.2.4 菌株的鉴定

采用酶法提取菌株 DNA^[19], 使用细菌通用引物 PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 PB (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因扩增。50 μL PCR 扩增体系: 10×Buffer 5.0 μL, dNTPs (10 mmol/L) 4.0 μL, PA、PB (10 μmol/L) 各 1.0 μL, DNA 模板 1 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 0.3 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 32 个循环;

72 °C 10 min。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段为 1 400–1 500 bp, 电泳验证后, 将阳性结果 PCR 产物送往昆明擎科生物科技有限公司进行测序。测序得到的 16S rRNA 基因序列在 EZ Biocloud 进行序列比对。使用 MEGA 7.0^[20]软件采用邻接法(Neighbor-Joining)^[21]构建系统进化树, 重复取样 1 000 次进行自展值(Bootstrap value)分析来评估系统进化树拓扑结构的稳定性。

2 结果与分析

2.1 红树林根际土壤放线菌多样性分析

使用 3 种分离培养基对 14 个红树林根际土壤样品中的放线菌进行分离。从红树林根际土壤样品中共分离到 413 株菌, 经形态和培养特征观察后除去重复菌株, 对 112 株菌进行 16S rRNA 基因测序。分离获得 65 株放线菌, 放线菌分布于棒状菌目(Corynebacteriales)、微球菌目(Micrococcales)、小单孢菌目(Micromonosporales)、丙酸杆菌目(Propionibacteriales)、链霉菌目(Streptomycetales) 5 个目, 棒状菌科(Corynebacteriaceae)、迪茨氏菌科

(Dietziaceae)、诺卡氏菌科(Nocardiaceae)、间孢囊菌科(Intrasporangiaceae)、微杆菌科(Microbacteriaceae)、微球菌科(Micrococcaceae)、原小单孢菌科(Promicromonosporaceae)、小单孢菌科(Micromonosporaceae)、类诺卡氏菌科(Nocardioideae)、链霉菌科(Streptomycetaceae) 10 个科, 链霉菌属(*Streptomyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、地杆菌属(*Terrabacter*)、纤维微菌属(*Cellulosimicrobium*)、威廉姆斯氏菌属(*Williamsia*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、微球菌属(*Micrococcus*)、棒状菌属(*Corynebacterium*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、柠檬酸球菌属(*Citricoccus*) 15 个属。采用 YIM171 培养基分离获得的菌株数量最多, 获得 7 个属放线菌; 采用 YIM91 培养基获得的放线菌多样性丰富, 获得 11 个属放线菌; 使用 MA 培养基分离获得 5 个属放线菌, 具体分布情况如表 1 所示。部分菌株采用邻接法构建系统发育树如图 1 所示。红球菌属(*Rhodococcus*)、

表 1 使用 YIM171、MA、YIM91 培养基分离到的放线菌分布情况

Table 1 Distribution of actinomycetes isolated from YIM171/MA/YIM91 medium

Order	Family	Genus	YIM171	MA	YIM91
Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	–	–	1
	Dietziaceae	<i>Dietzia</i>	–	–	1
	Nocardiaceae	<i>Nocardia</i>	1	–	1
		<i>Rhodococcus</i>	4	5	3
		<i>Williamsia</i>	–	–	1
Micrococcales	Intrasporangiaceae	<i>Terrabacter</i>	–	–	1
	Microbacteriaceae	<i>Agromyces</i>	1	2	2
		<i>Microbacterium</i>	2	–	–
	Micrococcaceae	<i>Arthrobacter</i>	–	1	–
		<i>Citricoccus</i>	–	–	1
		<i>Micrococcus</i>	1	–	–
	Promicromonosporaceae	<i>Cellulosimicrobium</i>	–	–	2
Micromonosporales	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora</i>	2	–	1
Propionibacteriales	Nocardioideae	<i>Nocardioides</i>	–	1	–
Streptomycetales	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>	24	1	6
Total of genus		15	7	5	11

注: –: 未分离到。

Note: –: Strains absent.

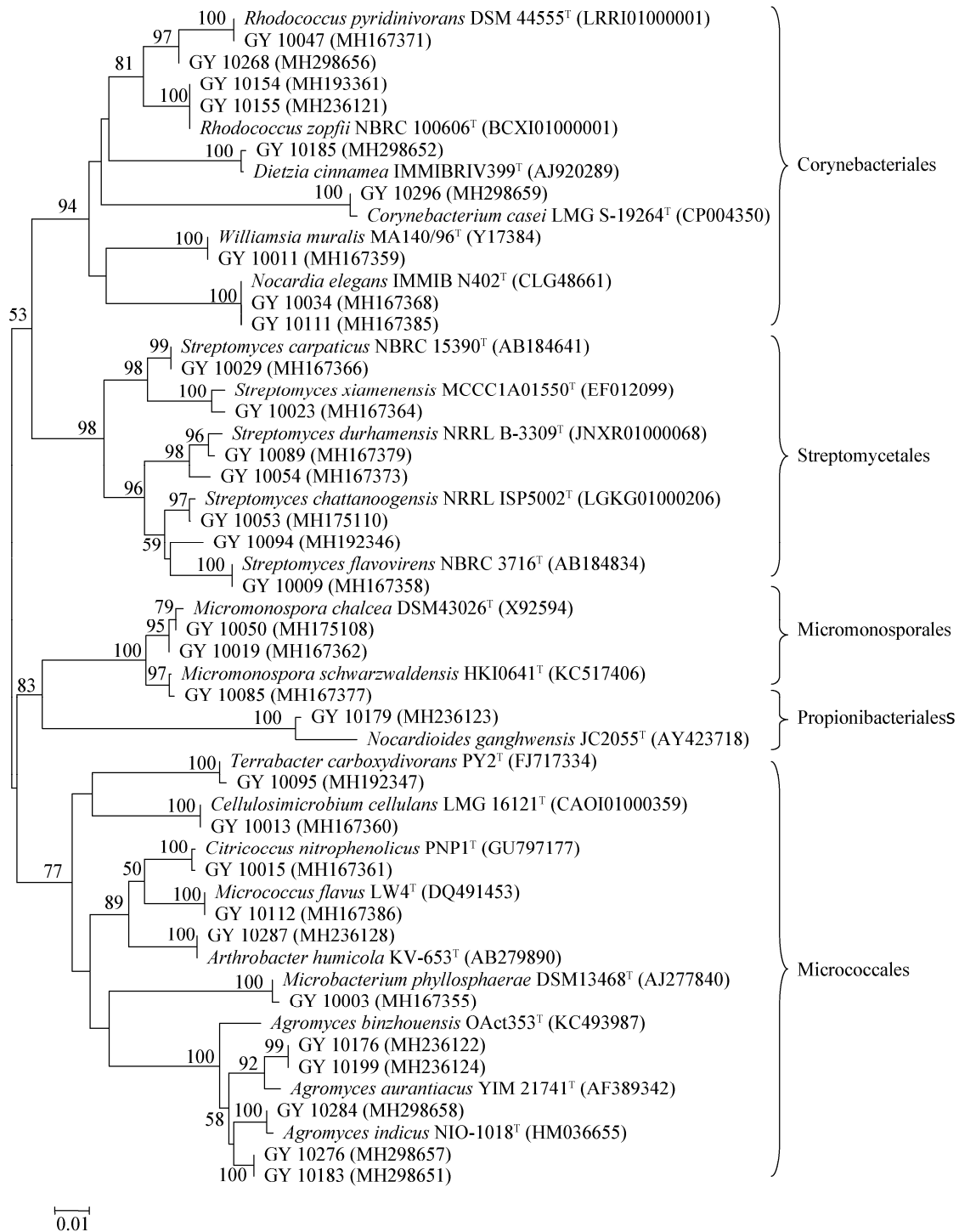


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建茅尾海红树林根际土壤部分放线菌的系统进化树

Figure 1 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of partial actinomycetes from rhizosphere soil sample of mangrove habitats, Maowei Sea

注: 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数值为 1 000 次 Bootstrap 分析所得值, 小于 50% 的值隐藏; 标尺为 0.01 进化距离。

Note: The accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of these strains were displayed in parentheses; Bootstrap values <50% based on 1 000 replications at branch nodes are hidden; Bar represents 0.01 substitutions per nucleotide positions.

壤霉菌属(*Agromyces*)、链霉菌属(*Streptomyces*) 3 个属的放线菌在 3 种分离培养基上都分离获得。使用 YIM171 和 YIM91 分离到 2 个相同的放线菌属, 分别为诺卡菌属(*Nocardia*) 和小单孢菌属(*Micromonospora*)。棒状菌属(*Corynebacterium*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、威廉姆斯氏菌属(*Williamsia*)、地杆菌属(*Terrabacter*)、柠檬酸球菌属(*Citricoccus*)、纤维微球菌属(*Cellulosimicrobium*) 6 个属的放线菌只在 YIM91 培养基中被分离到, 如图 2 所示。此次分离实验得到的优势菌属为链霉菌属(*Streptomyces*), 其次是红球菌属(*Rhodococcus*), 与文献报道的红树林根际土壤样品中的优势菌属为链霉菌属(*Streptomyces*) 或小单孢菌属(*Micromonospora*) 一致^[22], 此次分离到小单孢菌属(*Micromonospora*) 菌株有 3 株, 可能与培养基选择种类少和培养基选择性有关。根据 16S rRNA 基因序列最大相似性低于 98.7% 为潜在新种的规则^[23], 发现由 MA 培养基获得的菌株中 GY 10176、GY 10179 与已发表的 *Agromyces aurantiacus* YIM 21741^T 和 *Nocardioides ganghwensis* JC2055^T 的相似

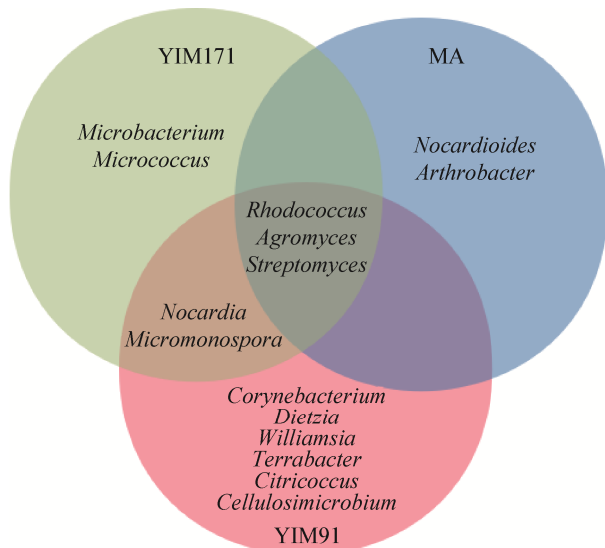


图 2 红树根际土壤样品中使用 YIM171、MA、YIM91 培养基分离放线菌属分布情况

Figure 2 Distribution of actinomycetes separated from rhizosphere soil sample of mangrove habitats, Maowei Sea in YIM171/MA/YIM91 medium

性分别为 98.26%、97.82%, 使用 YIM91 培养基分离到的菌株中 GY 10268、GY 10276 最大相似性为 98.67% 和 98.08%, 上述 4 株潜在新种鉴定情况另文发表。潜在新种占比为 3.57%。

2.2 红树林根皮放线菌分析

从 5 份红树植物根皮样品中共分离到 247 株菌, 经形态和培养特征观察后去除重复菌株, 取 89 株菌进行 16S rRNA 基因测序。19 株放线菌分布于棒状菌目(Corynebacteriales)、微球菌目(Micrococcales)、丙酸杆菌目(Propionibacteriales)、链霉菌目(Streptomycetales) 4 个目, 棒状菌科(Corynebacteriaceae)、甲基醯菌科(Demequinaceae)、间孢囊菌科(Intrasporangiaceae)、微杆菌科(Microbacteriaceae)、小单孢菌科(Micromonosporaceae)、类诺卡氏菌科(Nocardioidaceae)、链霉菌科(Streptomycetaceae) 7 个科, 棒状菌属(*Corynebacterium*)、*Lysinimicrobium*、地杆菌属(*Terrabacter*)、*Homoserinibacter*、链霉菌属(*Streptomyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、壤霉菌属(*Agromyces*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*) 10 个属。使用 YIM91 和 YIM171 培养基从红树林根皮样品中分别获得 7 个属放线菌, 其中获得 4 个相同属的放线菌, 分别为地杆菌属(*Terrabacter*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)、链霉菌属(*Streptomyces*)。具体分布情况如表 2 和图 3 所示, 图 4 是用邻接法构建的系统发育树。除相同菌属外, 使用 YIM91 培养基从红树林根皮样品中还获得棒状菌属(*Corynebacterium*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、考克氏菌属(*Kocuria*), 使用 YIM171 培养基分离获得 *Lysinimicrobium*、*Homoserinibacter* 两个稀有菌属。使用 YIM171 培养基分离到的菌株中 GY 40006、GY 40068、GY 40078 与已有效发表菌株的 16S rRNA 基因序列最大相似性分别为 98.57%、97.78%、97.72%, 使用 YIM91 培养基分离到的菌株中 GY 40071 的 16S rRNA 基因序列最高相似性为 97.91%, 4 株潜在新种鉴定情况另文发表。潜在新种占比 4.49%。

表 2 使用 YIM171、YIM91 培养基分离到的放线菌分布情况

Table 2 Distribution of actinomycetes isolated from YIM171/YIM91 medium

Order	Family	Genus	YIM171	YIM91
Corynebacteriales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	—	1
Micrococcales	Demequinaceae	<i>Lysinimicrobium</i>	1	—
	Intrasporangiaceae	<i>Terrabacter</i>	1	1
	Microbacteriaceae	<i>Agromyces</i>	1	—
		<i>Homoserinibacter</i>	1	—
		<i>Microbacterium</i>	3	1
	Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	—	1
Propionibacteriales	Nocardoidaceae	<i>Nocardioides</i>	—	1
Streptomycetales	Streptomycetaceae	<i>Kitasatospora</i>	1	1
		<i>Streptomyces</i>	2	3
Total of genus		10	7	7

注: —: 未分离到。

Note: —: Strains absent.

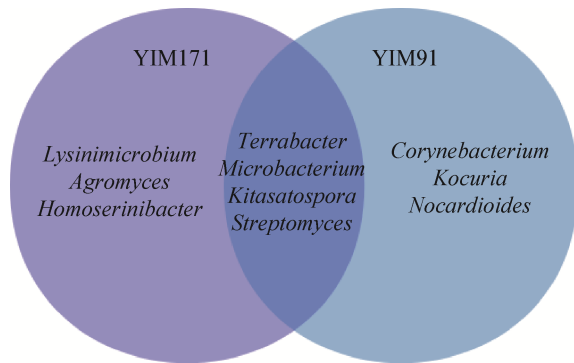


图 3 红树根皮样品中使用 YIM171、YIM91 培养基分离放线菌属分布情况

Figure 3 Distribution of actinomycetes from mangrove root bark samples, Maowei Sea in YIM171/YIM91 medium

3 讨论与结论

红树林生境周期性受到潮汐影响, 营养物质变化大, 微生物资源丰富, 已从微生物代谢产物中分离到许多具有活性的化合物, 近年来成为海洋药物研究的热点。随着微生物分离条件和培养技术的改进, 从红树林生境中分离获得了大量新物种。Hong 等^[24]使用 11 个选择性分离培养基从中国 8 个地区的红树林土壤和红树植物中分离到 2 000 多株放线菌, 选择 237 株菌进行鉴定, 放线菌分布于 5 个目 7 个科 10 个属, 分离获得的放线菌具有较强的抗菌和抗肿瘤活性, 同时检测到部分菌株代谢产物对酪

蛋白磷酸酶有抑制作用。何洁等^[25]使用 24 种不同的碳源对印度洋红树林沉积物样品进行分离, 获得的放线菌分布于 10 个科 16 个属, 分离到 35 株潜在新种。Dias 等^[26]使用 TSB 培养基从巴西红树林根际土壤中分离获得短杆菌属、皮杆菌属、库克菌属、不动盖球菌属、微杆菌属、涅斯捷连科菌属和罗氏菌属等 7 个属的放线菌。吴家法等^[27]使用改良高氏一号培养基, 从红树林土壤样品中分离到 117 株放线菌, 分布于 10 个科 19 个属, 还获得 6 株潜在的放线菌新种, 同时发现 23 株放线菌的次级代谢产物对香蕉枯萎病原菌有拮抗作用。本研究采用 3 种培养基对北部湾茅尾海红树林根际土壤放线菌进行分离, 分离获得 65 株放线菌, 分布在 5 个目 10 个科 15 个属, 分别是链霉菌属、微杆菌属、红球菌属、壤霉菌属、节杆菌属、诺卡氏菌属、地杆菌属、纤维微菌属、威廉姆斯氏菌属、小单孢菌属、类诺卡氏菌属、微球菌属、棒状菌属、迪茨氏菌属、柠檬酸球菌属, 还分离获得 4 株潜在新种。使用 YIM171、MA 和椰子汁-海藻糖培养基从红树林根际土壤样品中分别获得 7、5 和 11 个属的放线菌。采用 YIM171 和椰子汁-海藻糖培养基对红树林根皮放线菌进行分离, 分离获得 19 株放线菌, 分布在 4 个目 7 个科 10 个属, 分别是棒状菌属、*Lysinimicrobium*、地杆菌属、*Homoserinibacter*、链

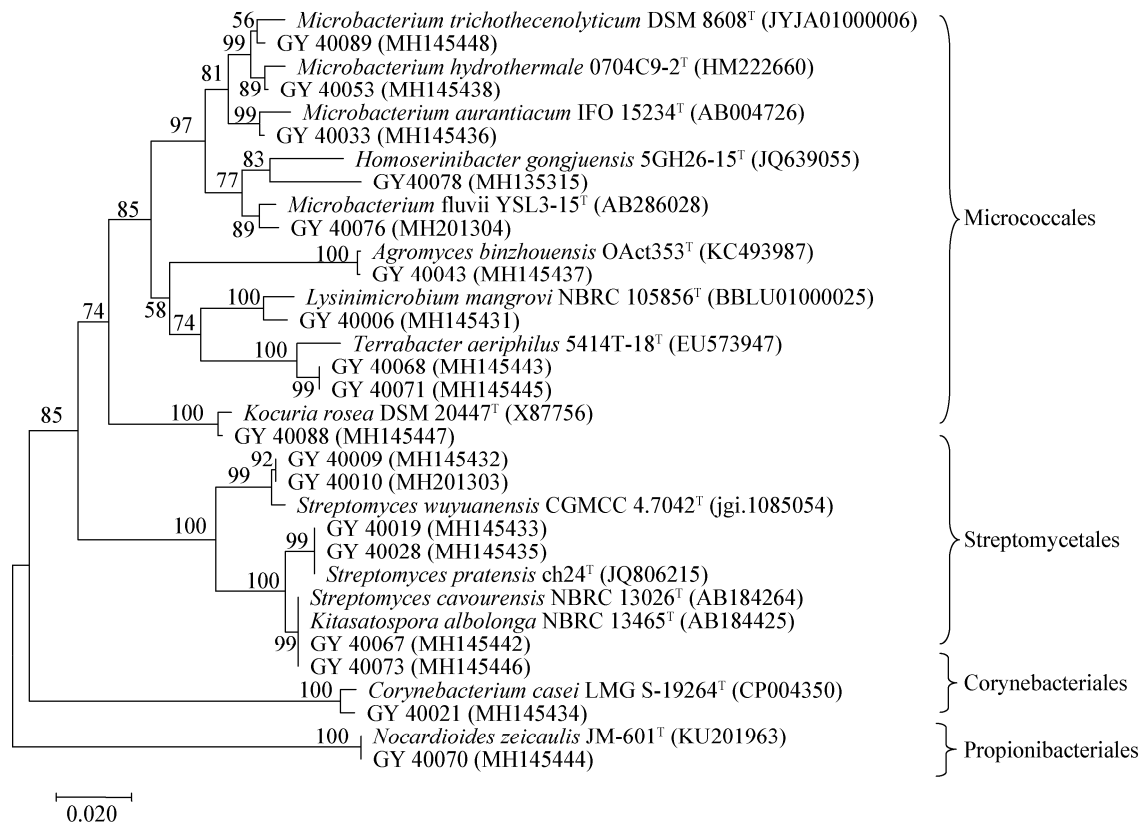


图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建茅尾海红树林根皮部分放线菌的系统进化树

Figure 4 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of partial actinomycetes from root bark sample of mangrove habitats, Maowei Sea

注: 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数值为 1 000 次 Bootstrap 分析所得值, 小于 50% 的值隐藏; 标尺为 0.02 进化距离。

Note: The accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of these strains are displayed in parentheses; Bootstrap values <50% based on 1 000 replications at branch nodes are hidden; Bar represents 0.02 substitutions per nucleotide positions.

霉菌属、微杆菌属、壤霉菌属、类诺卡氏菌属、考克氏菌属、北里孢菌属 10 个属, *Homoserinibacter* 属第一次在红树林生境中被发现。从红树根皮样品中获得 4 株潜在新种, 菌株的多项分类研究正在进行中。红树林生境中放线菌的优势菌属为链霉菌属或小单孢菌属, 本研究中优势菌属为链霉菌属, 与文献报道一致^[22]。使用新设计的椰子汁-海藻糖培养基在红树林生境两类样品中分离到的纤维微菌属、威廉姆斯氏菌属、地杆菌属、棒状菌属、迪茨氏菌属、柠檬酸球菌属、类诺卡氏菌属、考克氏菌属, 在 YIM171 和 MA 培养基中未分离到。通过对分离获得的放线菌进行分子生物学鉴定分析, 表明

广西北部湾茅尾海红树林生境蕴藏着丰富的放线菌资源。

椰汁中含有多种脂肪酸以及氨基酸、胆碱、类胡萝卜素、生长激素、类黄酮、维生素和大量的微量元素, 能促进微生物的生长^[28-29], 所以在椰子汁-海藻糖培养基中加入椰汁以期获得更多的微生物。研究人员对于分离条件和分离培养基一直在摸索中, 99% 的未知微生物(包括放线菌)是开发药物的源泉和希望^[30-33]。采用新设计的椰子汁-海藻糖培养基对北部湾茅尾海红树林根际土壤和根皮中放线菌进行分离, 从放线菌属水平上与其他分离培养基进行比较发现, 椰子汁-海藻糖培养基分离放线菌

有较大优势。本文结果显示, 广西北部湾茅尾海红树林根际土壤和红树林根皮放线菌多样性丰富, 潜在新种(未知菌)比例为 3.57%–4.49%。使用椰子汁-海藻糖培养基获得的放线菌多样性丰富, 同时获得 3 株潜在新种, 因此, 椰子汁-海藻糖培养基可作为放线菌分离培养基。

REFERENCES

- [1] Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2012, 65(8): 385-395
- [2] Li YQ, Li YQ, Li MG, et al. Antibiotics produced by rare actinomycetes[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2008, 33(4): 193-197 (in Chinese)
李一青, 李艳琼, 李铭刚, 等. 稀有放线菌产生的抗生素[J]. *中国抗生素杂志*, 2008, 33(4): 193-197
- [3] Jose PA, Jebakumar SRD. Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4: 240
- [4] Liu CB, Jiang Y, Wang XY, et al. Diversity, antimicrobial activity, and biosynthetic potential of cultivable actinomycetes associated with lichen symbiosis[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74(3): 570-584
- [5] Parrot D, Antony-Babu S, Intertaglia L, et al. Littoral lichens as a novel source of potentially bioactive Actinobacteria[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 15839
- [6] Xu LH, Li WJ, Liu ZH, et al. *Actinomycete Systematic*[M]. Beijing: Science Press, 2007: 12 (in Chinese)
徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. *放线菌系统学*[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 12
- [7] Alongi DM. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments[J]. *Microbial Ecology*, 1988, 15(1): 59-79
- [8] Holguin G, Gonzalez-Zamorano P, De-Bashan LE, et al. Mangrove health in an arid environment encroached by urban development — a case study[J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 363(1/3): 260-274
- [9] Suksaard P, Duangmal K, Srivibool R, et al. *Jiangella mangrovi* sp. nov., isolated from mangrove soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(8): 2569-2573
- [10] Wang RJ, Chen C, Su Y, et al. *Agromyces mangrovi* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from Mangrove Soil[J]. *Current Microbiology*, 2018, 75(8): 1055-1061
- [11] Lee LH, Azman AS, Zainal N, et al. *Microbacterium mangrovi* sp. nov., an amyolytic actinobacterium isolated from mangrove forest soil[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(10): 3513-3519
- [12] Sengupta S, Pramanik A, Ghosh A, et al. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem[J]. *Bmc Microbiology*, 2015, 15(1): 1-16
- [13] Ser HL, Mutalib NSA, Yin WF, et al. Evaluation of antioxidative and cytotoxic activities of *Streptomyces pluripotens* MUSC 137 isolated from mangrove soil in Malaysia[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1398
- [14] Rosmine E, Varghese SA. Isolation of actinomycetes from mangrove and estuarine sediments of Cochin and screening for antimicrobial activity[J]. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2016, 4(3): 207-210
- [15] Li CG. Distribution and forest structure of mangrove in Guangxi[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2003, 27(5): 15-19 (in Chinese)
李春干. 广西红树林资源的分布特点和林分结构特征[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 2003, 27(5): 15-19
- [16] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1995, 45(2): 240-245
- [17] Jiang Y, Cao YR, Zhao LX, et al. Ultrasonic treatment of soil samples for actinomycete isolation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(8): 1094-1097 (in Chinese)
姜怡, 曹艳茹, 赵立兴, 等. 超声波处理土样分离放线菌[J]. *微生物学报*, 2010, 50(8): 1094-1097
- [18] Chen DB, Liu CB, Jiang Y, et al. Diversity and bioactivity of un-cultured and cultivable actinomycetes from three toxic plants in Xishuangbanna, China[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(5): 1100-1111 (in Chinese)
陈东波, 柳成宾, 姜怡, 等. 来自西双版纳 3 种有毒植物的免培养与纯培养放线菌多样性及生物活性[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(5): 1100-1111
- [19] Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 33(1): 17-20
- [20] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111-120
- [21] 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
- [22] Tian XP, Zhang S, Li WJ. Advance in marine actinobacterial research — a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(2): 161-169 (in Chinese)
田新朋, 张偲, 李文均. 海洋放线菌研究进展[J]. *微生物学报*, 2011, 51(2): 161-169
- [23] Chun J, Oren A, Ventosa A, et al. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(1): 461-466
- [24] Hong K, Gao AH, Xie QY, et al. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China[J]. *Marine Drugs*, 2009, 7(1): 24-44
- [25] He J, Zhang DF, Xu Y, et al. Diversity and bioactivities of culturable marine actinobacteria isolated from mangrove

- sediment in Indian ocean[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(10): 1195-1202 (in Chinese)
何洁, 张道锋, 徐盈, 等. 印度洋红树林沉积物可培养海洋放线菌多样性及其活性[J]. *微生物学报*, 2012, 52(10): 1195-1202
- [26] Dias ACF, Andreote FD, Dini-Andreote F, et al. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(7): 1305-1311
- [27] Wu JF, Wu ST, Li ZM, et al. Biodiversity and screening of culturable actinobacteria against *Fusarium oxysporum* isolated from mangrove soil in Maowei sea[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2017, 42(4): 294-301 (in Chinese)
吴家法, 吴思婷, 李智鸣, 等. 茅尾海红树林土壤可培养放线菌多样性及其抗尖孢镰刀菌活性分析[J]. *中国抗生素杂志*, 2017, 42(4): 294-301
- [28] Solangi AH, Iqbal MZ. Chemical composition of meat (kernel) and nut water of major coconut (*Cocos nucifera* L.) cultivars at coastal area of Pakistan[J]. *Pakistan Journal of Botany*, 2011, 43(1): 357-363
- [29] Zhou BG. A preliminary study on the application of coconut juice as a medium[J]. *Guangdong Medical Journal*, 1965(S3): 186-188 (in Chinese)
周炳庚. 应用椰子汁做培养基的初步研究[J]. *广东医学*, 1965(S3): 186-188
- [30] Jiao RS. An important mission for microbiologists in the new century — cultivation of the unculturable microorganisms[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2004, 20(5): 641-645 (in Chinese)
焦瑞身. 新世纪微生物学者的一项重要任务——未培养微生物的分离培养[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(5): 641-645
- [31] Xu LH, Lou K, Zhang H, et al. *Microbiological Resources*[M]. 2nd Edition. Beijing: Science Press, 2010: 90 (in Chinese)
徐丽华, 娄恺, 张华, 等. *微生物资源学*[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2010: 90
- [32] Jiang Y, Cao YR, Zhao LX, et al. Large numbers of new bacterial taxa found by Yunnan Institute of Microbiology[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(8): 709-712
- [33] Diminic J, Starcevic A, Lisfi M, et al. Evolutionary concepts in natural products discovery: what actinomycetes have taught us[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(2): 211-217

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 月刊, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 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、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物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改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计, 本刊 2012 年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连年获得“百种中国杰出学术期刊奖”, 并入选“中国精品科技期刊”, 成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2018 年每册定价 80 元, 全年 960 元, 我们免邮费寄刊。

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413