



## 白蚁巢来源链霉菌 T12 的分离鉴定及其抗菌活性代谢产物

张萍华<sup>1#</sup>, 靳丽萍<sup>1#</sup>, 尹彩萍<sup>1</sup>, 陈佳琪<sup>1</sup>, 孙飞飞<sup>1</sup>, 李宗平<sup>2\*</sup>, 张应烙<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

<sup>2</sup> 湖北省烟草科学研究院, 湖北 武汉 430030

<sup>3</sup> 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

**摘要:**【目的】探索黑翅土白蚁巢中链霉菌发酵产物的抗菌活性, 并对其抗菌成分进行研究。【方法】通过牛津杯法测试菌株发酵液对 4 种致病菌的抗菌活性, 筛选出活性菌株 T12; 利用分子生物学 16S rRNA 序列分析确定 T12 的分类地位; 运用多种色谱方法从乙酸乙酯粗提物中分离纯化活性化合物, 利用质谱和核磁共振谱鉴定其化学结构; 结合滤纸片法测定化合物的抗菌活性。【结果】T12 被鉴定为 *Streptomyce* sp., 当供试浓度为 30 μg/滤纸片时, 该菌发酵液的乙酸乙酯萃取物对金黄色葡萄球菌与白色念珠菌的抑菌效果显著, 抑菌圈直径分别为 20.1 mm 和 17.4 mm。从乙酸乙酯萃取物中分离得到 2 个单体化合物 geldanamycin (**1**) 和 17-O-demethylgeldanamycin (**2**)。抗菌活性测试表明, 在供试浓度 30 μg/滤纸片时, 化合物 **1** 和 **2** 表现出很好的抑菌活性, 对金黄色葡萄球菌的抑制圈直径分别为 14.6 mm 和 14.5 mm, 与阳性对照硫酸庆大霉素的活性相当, 对白色念珠菌的抑制圈直径分别为 10.9 mm 和 13.9 mm, 与阳性对照两性霉素的活性相当。【结论】菌株 T12 具有开发为新型微生物源杀菌剂的应用价值。

**关键词:** 黑翅土白蚁巢, 链霉菌, 代谢产物, 抗菌活性

由于抗生素的不规范使用和致病微生物不断增强的耐药性, 导致搜寻更新颖、更安全和副作用少的抗菌化合物的需求与日俱增<sup>[1-2]</sup>。土壤微生物代谢产物曾经是抗生素的丰富来源, 如氯霉素、链霉素和青霉素等抗生素都是从土壤微生物中分离得到。

然而, 由于长期重复从相同或相似的土壤微生物中分离天然产物往往是已知化合物, 获取新颖骨架抗菌天然产物的可能性大大降低<sup>[3]</sup>。因昆虫的特殊生活环境及与周围生物的相互作用关系, 从其共生微生物中能够发现结构独特、具有抗菌活性的天然产物<sup>[4]</sup>。

基金项目: 国家自然科学基金(31770007, 21272215)

<sup>#</sup>并列第一作者。

\*通信作者。李宗平, Tel: +86-27-83606073, E-mail: 2060029324@qq.com; 张应烙, Tel: +86-551-65786129, E-mail: zhangyl@ahau.edu.cn

收稿日期: 2020-04-16; 修回日期: 2020-08-13; 网络出版日期: 2020-11-10

白蚁巢具有食药两用功能<sup>[5]</sup>,是等翅目昆虫土白蚁的主要生活与繁殖场所,富含巨大的放线菌物种多样性<sup>[6]</sup>;对泰国3种白蚁巢放线菌的抗菌活性研究表明其中超过20%的放线菌至少能抑制1种供试致病菌的生长<sup>[7]</sup>。在对1株黑翅土白蚁巢放线菌的抗菌活性研究的基础上<sup>[8]</sup>,我们进一步从黑翅土白蚁巢中筛选出1株具有显著抗菌活性的菌株并对其活性成分进行解析,以期新型抗生素的开发奠定研究基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:**供试白蚁巢:黑翅土白蚁巢采自浙江师范大学校园内(29°00'17.37" N, 119°29'54.84" E)。

**1.1.2 供试致病菌:**枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, ATCC6633)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC6538)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC8739)、白色念珠菌(*Candida albicans*, ATCC10231)。

**1.1.3 供试培养基:**马铃薯葡萄糖(PDA)培养基、胰蛋白胨酵母(LB)培养基、高氏一号(GS)培养基,按常规方法配制。

**1.1.4 仪器与试剂:**超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);ZWZR-2102 摇床(上海智诚分析仪器制造有限公司);PCR 仪(德国 Eppendorfs 公司);BUCHI 旋转蒸发仪 R-210 (瑞士步琦有限公司);核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);Mariner 质谱仪(美国 ABI 公司)。

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒[生工生物工程(上海)有限公司];柱层层析硅胶(青岛海洋化工有限公司);氘代试剂(宁波旋光医药)。

### 1.2 菌株的分离

根据文献中的方法<sup>[9]</sup>,取约 0.1 cm<sup>3</sup>的黑翅土白蚁巢,在无菌条件下,添加适量无菌生理盐水研磨至均匀,并制成 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>和 10<sup>-3</sup>等3个浓度梯度。分别取上述稀释液 200 μL 涂布于高氏一号固体培养基上,28 °C 恒温培养。待长出菌落后,挑取边缘菌体多次划线获得纯培养物并保存于 GS 试管斜面上备用。

### 1.3 菌株的发酵及活性测试

将分离得到的放线菌菌株接种于含 GS 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中,180 r/min、28 °C 下摇床培养 7 d,用纱布过滤发酵物得到滤液。参考文献的牛津杯法测定滤液的抗菌活性<sup>[10]</sup>:将大肠杆菌(*E. coli*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)置于 LB 液体培养基中 37 °C 培养 24 h,白色念珠菌(*C. albicans*)置于 PDA 液体培养基中 28 °C 培养 24 h,随后用无菌水将菌液浓度稀释到 (0.8–1.2)×10<sup>8</sup> CFU/mL 并取 200 μL 均匀涂布于相应培养基上。用镊子挑取牛津杯置于培养基中,每杯加入 100 μL 待测发酵液,每处理设 3 次重复,分别置于适宜温度下培养,观察是否有抑菌圈产生。

### 1.4 菌株 T12 的分子生物学鉴定

菌株活化后,提取基因组 DNA,参照文献进行 PCR 扩增、测序,并构建系统发育树<sup>[11]</sup>。

### 1.5 菌株 T12 发酵液不同极性部分的抗菌活性

参照 1.3 的方法,对菌株 T12 进行液体发酵,用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇分别对 1 L 发酵液进行萃取,获得 3 个有机相(石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相)和水相的不同极性的萃取物。分别用丙酮将 4 种提取物配制为 6 mg/mL 的母液。用滤纸片法测试提取物对病原菌的拮抗活性,用“十

字交叉法”记录抑菌圈，具体方法参见文献[11]。

## 1.6 活性次级代谢产物的分离与鉴定及抗菌活性

菌株 T12 发酵液共 25 L，用乙酸乙酯等体积萃取 3 次，减压浓缩获得 2.8 g 粗浸膏，粗浸膏通过多种色谱方法(硅胶柱层析、凝胶柱层析、薄层层析等)分离与纯化得到单体化合物。用质谱仪测定分子量，用核磁共振仪进行  $^1\text{H}$ -NMR 谱和  $^{13}\text{C}$ -NMR 谱分析。参考 1.5 的滤纸片法，对分离得到的单体化合物的抗菌活性进行测试。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株的筛选与鉴定

从白蚁巢中共筛选到 32 株放线菌，对菌株发

酵液进行活性测试，其中菌株 T12 抑菌能力最强，对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌圈直径分别为 18.6 mm 和 19.5 mm。经过 PCR 扩增所得的 T12 菌株 16S rRNA 基因片段长度为 1431 bp。测序结果经 BLAST 比对，发现 T12 的序列与链霉菌属 *Streptomyces malaysiensis* 的相关序列(GenBank 登录号: HQ607429)相似性达 99%，两者在系统发育树上处于同一分支(图 1)，将菌株 T12 初步鉴定为链霉菌属菌株(*Streptomyces* sp.)。

### 2.2 菌株粗提物的抗菌活性

链霉菌 T12 提取物对 4 种致病菌的生长抑制作用结果见表 1，在供试浓度为 30  $\mu\text{g}$ /滤纸片时，乙酸乙酯提取物对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌的抑菌效果明显，抑菌圈直径分别达

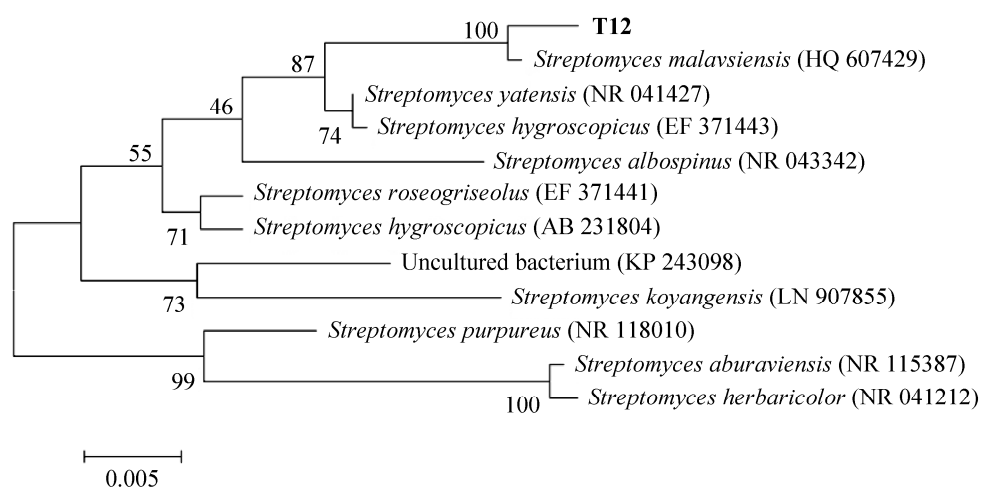


图 1. 基于 16S rRNA 序列构建的白蚁巢相关链霉菌 T12 系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences of termite nest associated T12.

表 1. 链霉菌 T12 不同极性萃取物拮抗致病菌的抑菌圈直径(mm)

Table 1. Inhibition zone diameter of different polar extracts from *Streptomyces* sp. T12 against pathogens (mm)

Pathogenic microorganism	Petroleum ether extract	Ethyl acetate extract	Butanol extract	Water extract	Gentamicin sulfate	Amphotericin
<i>E. coli</i>	NI	16.1±0.7	NI	NI	13.2±0.8	NI
<i>S. aureus</i>	12.0±0.7	20.1±1.3	NI	NI	18.2±1.1	NI
<i>B. subtilis</i>	NI	NI	NI	NI	16.6±1.3	NI
<i>C. albicans</i>	13.6±0.4	17.4±0.6	NI	NI	NI	13.2±0.8

Amphotericin and gentamicin sulfate were the positive control of *C. albicans* and pathogenic bacteria respectively; NI=not inhibitory effect.

20.1 mm、16.1 mm 和 17.4 mm, 与阳性对照相当; 而石油醚提取物对供试菌的抑制作用较弱, 其抑菌圈直径范围为 12.0–13.6 mm; 正丁醇提取物和水相均无活性。

### 2.3 活性代谢产物的结构鉴定及其抗菌活性

在活性跟踪指导下, 经凝胶柱层析等多种色谱方法, 从链霉菌 T12 乙酸乙酯粗提物中分离获得两个单体化合物 **1** 和 **2**, 经 ESI-MS 和核磁共振谱分析, 获得相应波谱数据并对其结构进行鉴定。

化合物 **1**: 高分辨质谱(图 2)显示: 最强的  $m/z$  出现在 583.2640, 与  $C_{29}H_{40}N_2O_9Na$   $[M+Na]^+$  的 583.2640 相符合, 说明其分子式为  $C_{29}H_{40}N_2O_9$ , 分子量为 560.2748, 与理论值 560.2734 误差仅 2.5, 分子式准确;  $^1H$  NMR 图(图 S1, <http://journals.im.ac.cn/html/actamicrocn/2021/2/202102018.htm>, 氘代试剂为  $CDCl_3$ )  $\delta$ =8.71 (1H, s, -NH), 7.28 (1H, s, H-19), 6.94 (1H, d,  $J$  = 11.6 Hz, H-3), 6.57 (1H, t,  $J$  = 11.6 Hz, H-4), 5.87 (1H, t,  $J$  = 10.3 Hz, H-5), 5.81 (1H, d,  $J$  = 9.4 Hz, H-9), 5.19 (1H, s, H-7), 4.80 (2H, br s, -OCONH<sub>2</sub>), 4.31 (1H, d,  $J$  = 9.3 Hz, H-6), 4.12 (3H, s, 17-OCH<sub>3</sub>), 3.53 (1H, m, H-11), 3.39 (1H, m, H-12), 3.36 (3H, s, 12-OCH<sub>3</sub>), 3.29 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 3.02 (1H, br s, 11-OH), 2.78 (1H, m, H-10), 2.47

(2H, m, H-15), 2.02 (3H, s, 2-CH<sub>3</sub>), 1.82 (1H, m, H-13A), 1.79 (3H, br s, 8-CH<sub>3</sub>), 1.76 (1H, m, H-13B), 1.66 (1H, m, H-14), 0.97 (6H, overlap, 10-CH<sub>3</sub>, 14-CH<sub>3</sub>), 以上氢谱说明其含有 5 个不饱和和氢( $\delta$ =6.94, 6.57, 5.87, 5.81, 5.19)、4 个甲基( $\delta$ =2.02, 1.79, 0.97)和 3 个甲氧基( $\delta$ =4.12, 3.36, 3.29);  $^{13}C$  NMR 图(图 S2, <http://journals.im.ac.cn/html/actamicrocn/2021/2/202102018.htm>, 氘代试剂为  $CDCl_3$ )  $\delta$  185.1 (C-21), 184.2 (C-18), 168.2 (C-1), 157.0 (C-17), 156.2 (-OCONH<sub>2</sub>), 138.1 (C-20), 136.5 (C-5), 134.9 (C-2), 133.4 (C-8), 133.1 (C-9), 127.7 (C-16), 127.3 (C-3), 126.3 (C-4), 111.8 (C-19), 81.8 (C-7), 81.4 (C-6), 81.1 (C-12), 72.8 (C-11), 61.7 (17-OCH<sub>3</sub>), 57.4 (6-OCH<sub>3</sub>), 56.9 (12-OCH<sub>3</sub>), 34.7 (C-13), 32.9 (C-15), 32.3 (C-10), 28.1 (14-CH<sub>3</sub>), 23.0 (C-14), 13.0 (2-CH<sub>3</sub>), 12.6 (8-CH<sub>3</sub>), 12.5 (10-CH<sub>3</sub>), 上述碳谱说明其含有 2 个羰基( $\delta$ =185.1, 184.2)和化学位移位于 111.8–168.2 间的 12 个不饱和碳。以上波谱数据与文献[12–13]报道的 geldanamycin 数据基本一致, 因此, 确定该化合物为 geldanamycin。

化合物 **2**: 高分辨质谱(图 3)显示: 最强的  $m/z$  出现在 569.2471, 与  $C_{28}H_{38}N_2O_9Na$   $[M+Na]^+$  的 569.2471 相符合, 说明其分子式为  $C_{28}H_{38}N_2O_9$ , 分子量为 546.2579, 与理论值 546.2577 误差仅 0.4,

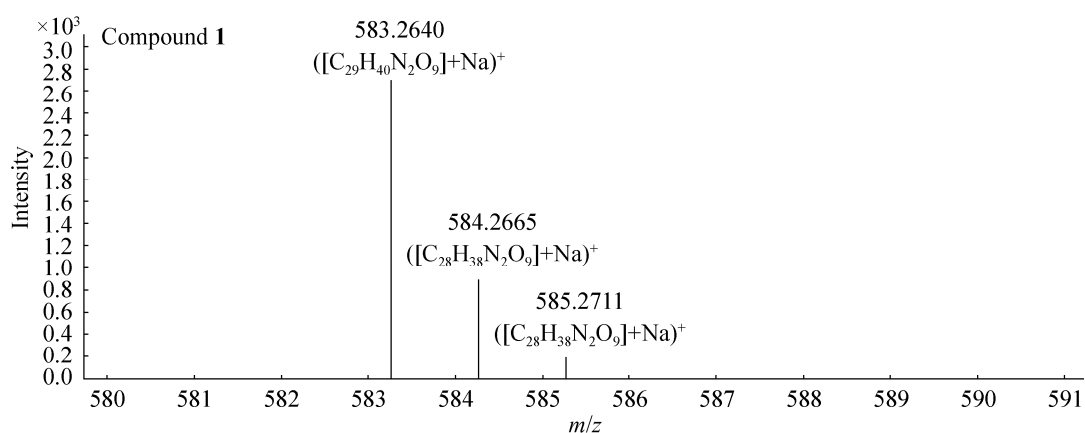


图 2. 化合物 **1** 的质谱

Figure 2. Mass spectrogram of compound **1**.

分子式准确;<sup>1</sup>H NMR 图(图 S3, 氘代试剂为 CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ =8.95 (1H, s, -NH), 7.51 (1H, s, 17-OH), 7.42 (1H, s, H-19), 6.96 (1H, d,  $J$ =11.6 Hz, H-3), 6.58 (1H, t,  $J$ =11.3 Hz, H-4), 5.91 (1H, t,  $J$ =15.5 Hz, H-5), 5.81 (1H, d,  $J$ =9.9 Hz, H-9), 5.18 (1H, s, H-7), 4.72 (2H, br s, -OCONH<sub>2</sub>), 4.32 (1H, d,  $J$ =9.3 Hz, H-6), 3.54 (1H, m, H-11), 3.39 (1H, m, H-12), 3.36 (3H, s, 12-OCH<sub>3</sub>), 3.31 (3H, s, 6-OCH<sub>3</sub>), 2.80 (1H, m, H-10), 2.45 (2H, m, H-15), 2.03 (3H, s, 2-CH<sub>3</sub>), 1.80 (3H, d,  $J$ =0.9 Hz, 8-CH<sub>3</sub>), 1.77 (2H, m, H-13A),

1.73 (1H, m, H-13B), 1.01 (3H, d,  $J$ =6.2 Hz, 14-CH<sub>3</sub>), 0.97 (3H, d,  $J$ =7.0 Hz, 10-CH<sub>3</sub>), 上述氢谱说明其含有 5 个不饱和氢( $\delta$ =6.96, 6.58, 5.91, 5.81, 5.18)、4 个甲基( $\delta$ =2.03, 1.80, 1.01, 0.97)和 2 个甲氧基( $\delta$ =3.36, 3.31)。以上波谱数据与文献[13]报道的 17-O-demethylgeldanamycin 数据基本一致, 因此, 确定该化合物为 17-O-demethylgeldanamycin。这 2 个化合物具体的分子结构如图 4 所示。

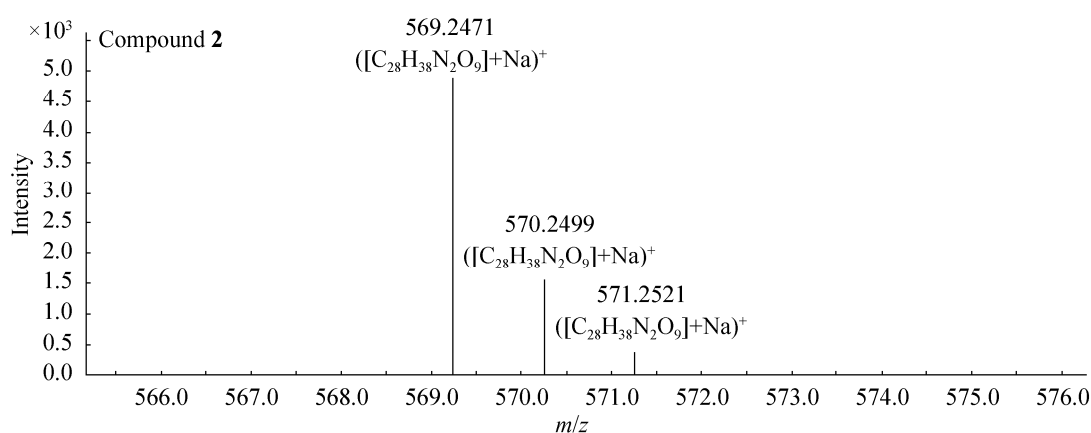


图 3. 化合物 2 的质谱

Figure 3. Mass spectrogram of compound 2.

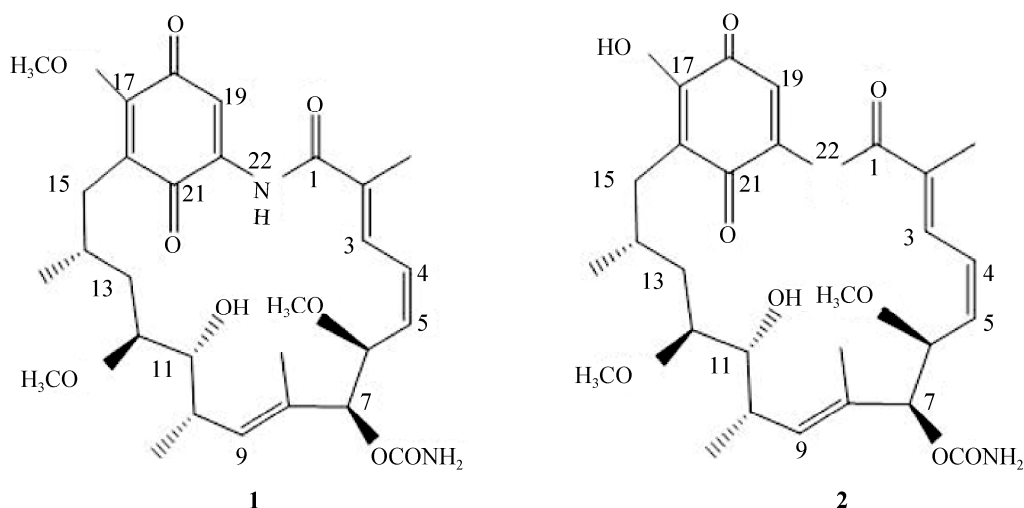


图 4. 化合物 1 和 2 结构图

Figure 4. Molecular structure of compounds 1 and 2.

两个单体化合物的抑菌作用如表 2 和图 5 所示, 化合物 **1** 和 **2** 在浓度为 30  $\mu\text{g}$ /滤纸片时, 对金黄色葡萄球菌有较强的拮抗作用, 抑菌圈直径分别达 14.6 mm 和 14.5 mm, 与硫酸庆大霉素的抑菌效果相当; 与阳性对照两性霉素相比, 两种单体化合物对白色念珠菌具较好的抑制作用, 抑菌圈直径分别为 10.9 mm 和 13.9 mm。

### 3 讨论

本文从黑翅白蚁巢筛选到的链霉菌 T12 具有较好的抗菌活性, 其发酵液对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌圈直径均大于 18.6 mm, 因此, 黑翅土白蚁巢链霉菌 T12 作为微生物源杀菌剂值得进一步研究。经分子生物学鉴定将菌株 T12 确定为链霉菌(*Streptomyces* sp.)。进一步从目标菌株链霉菌 T12 乙酸乙酯粗浸膏中分离出 2 个单体化合物 geldanamycin 和 17-O-demethylgeldanamycin, 这两个化合物均属于安莎霉素类化合物中的茚安莎霉素亚族, 目前已有报道这两种化合物均具有抗肿瘤活性<sup>[14-15]</sup>, 也有报道 geldanamycin 对多种病原微生物具有抑制作用<sup>[16-17]</sup>, 而 17-O-demethylgeldanamycin 的抗菌活性尚未见报

道。本文研究首次发现: 当供试浓度为 30  $\mu\text{g}$ /滤纸片时, 化合物 17-O-demethylgeldanamycin 对白色念珠菌和金黄色葡萄球菌具有较强的抑制活性, 抑菌圈直径分别为 13.9 mm 和 14.5 mm, 与阳性对照抑菌作用相当; geldanamycin 对白色念珠菌与金黄色葡萄球菌也表现出一定的抑制作用, 抑菌圈直径分别为 10.9 mm 和 14.6 mm。因此单体化合物 **1** 与 **2** 作为抗菌先导化合物具有进一步开发的潜力。关于这两种单体化合物的安全性及活性作用机理等, 还有待于进一步的研究探讨。

表 2. 化合物 **1** 和 **2** 对 3 种致病细菌和白色念珠菌的抑菌圈直径(mm)

Table 2. Inhibition zone dimeters of compounds **1** and **2** against three pathogenic bacteria and *C. albicans* (mm)

Compounds	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
<b>1</b>	8.9 $\pm$ 1.2	10.9 $\pm$ 1.9	14.6 $\pm$ 1.9	NI
<b>2</b>	NI	13.9 $\pm$ 1.5	14.5 $\pm$ 0.6	NI
Gentamicin sulfate	20.3 $\pm$ 2.8	NI	18.2 $\pm$ 1.1	13.2 $\pm$ 0.8
Amphotericin	NI	16.6 $\pm$ 1.3	NI	NI

Amphotericin and gantamycin sulfate were the positive control of *C. albicans* and pathogenic bacteria respectively; results were presented as the mean  $\pm$  standard error; NI=no inhibitory effect.

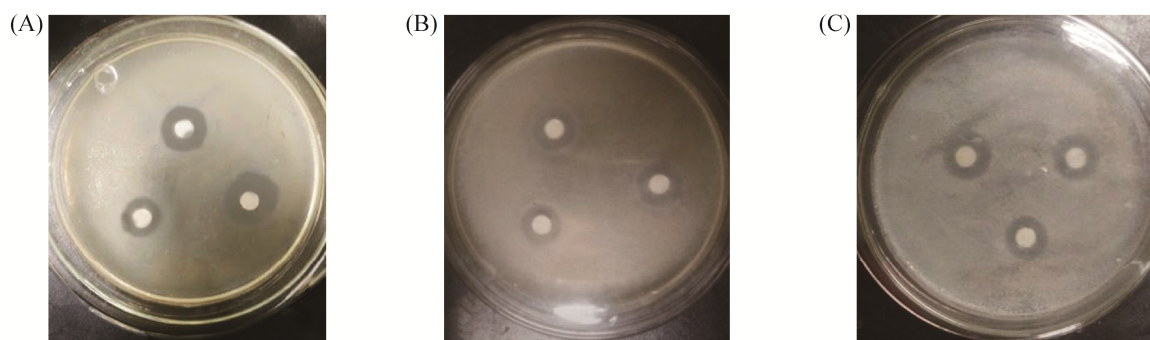


图 5. 化合物 **1** 和 **2** 的抗菌活性

Figure 5. Antimicrobial activities of compounds **1** and **2**. Antibacterial activities of compounds **1** (A) and **2** (B) against *S. aureus*; antimicrobial activities of compound **2** against *C. albicans* (C).

## 参考文献

- [1] Fisher MC, Hawkins NJ, Sanglard D, Gurr SJ. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 2018, 360(6390): 739–742.
- [2] Hossain MN, Rahman MM. Antagonistic activity of antibiotic producing *Streptomyces* sp. against fish and human pathogenic bacteria. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2014, 57(2): 233–237.
- [3] Kumar PS, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Isolation, screening and partial purification of antimicrobial antibiotics from soil *Streptomyces* sp. SCA 7. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 2014, 30(9): 435–446.
- [4] DeCorte BL. Underexplored opportunities for natural products in drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, 59(20): 9295–9304.
- [5] Yan SH, Peng XF, Zhang YQ, Sun X. Utilization of termite resources in China. *Chinese Bulletin of Entomology*, 2008, 45(2): 336–339. (in Chinese)  
严少辉, 彭心赋, 张永强, 孙叙. 我国白蚁资源利用的现状. *昆虫知识*, 2008, 45(2): 336–339.
- [6] Manjula A, Sathyavathi S, Pushpanathan M, Gunasekaran P, Rajendhran J. Microbial diversity in termite nest. *Current Science*, 2014, 106(10): 1430–1434.
- [7] Sujada N, Sungthong R, Lumyong S. Termite nests as an abundant source of cultivable actinobacteria for biotechnological purposes. *Microbes and Environments*, 2014, 29(2): 211–219.
- [8] Lu YH, Li S, Zhou DX, Zhang YL. Isolation and identification of termitarium antagonistic actinomycetes BYC 01 and its active metabolites. *Acta Microbiologica Sinica*, 54(7): 754–759. (in Chinese)  
卢贻会, 李帅, 周端瑛, 张应烙. 白蚁巢拮抗放线菌 BYC01 代谢产物的分离和鉴定. *微生物学报*, 2014, 54(7): 754–759.
- [9] Poulsen M, Oh DC, Clardy J, Currie CR. Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16763.
- [10] Zhao SL, Ren FE, Liu JL, Qin JC, Pan HY. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic actinomycetes strain to *Setosphaeria turcica*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(10): 1228–1236. (in Chinese)  
赵淑莉, 任飞娥, 刘金亮, 秦建春, 潘洪玉. 玉米大斑病生防放线菌的筛选鉴定及发酵条件优化. *微生物学报*, 2012, 52(10): 1228–1236.
- [11] 靳丽萍. 蜻蜓和白蚁共生菌的活性次生代谢产物的研究. 浙江师范大学硕士学位论文, 2017.
- [12] Qin HL, Panek JS. Total synthesis of the Hsp90 inhibitor geldanamycin. *Organic Letters*, 2008, 10(12): 2477–2479.
- [13] Shi NN, Wang HX, Lu CH, Liu Z, Shen YM. Ansamycins produced by *Streptomyces* sp. LZ35. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2011, 46(17): 1317–1320. (in Chinese)  
石姐姐, 王浩鑫, 鲁春华, 刘最, 沈月毛. 海洋放线菌 *Streptomyces* sp. LZ35 中的安莎霉素类化合物. *中国药理学杂志*, 2011, 46(17): 1317–1320.
- [14] Li S, Shao MW, Lu YH, Kong LC, Jiang DH, Zhang YL. Phytotoxic and antibacterial metabolites from *Fusarium proliferatum* ZS07 isolated from the gut of long-horned grasshoppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(36): 8997–9001.
- [15] Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, Lutz RJ, Yasui H, Okawa Y, Kiziltepe T, Vallet S, Pozzi S, Santo L, Perrone G, Tai YT, Cirstea D, Raje NS, Uherek C, Dälken B, Aigner S, Osterroth F, Munshi N, Richardson P, Anderson KC. The monoclonal antibody nBT062 conjugated to cytotoxic maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells *in vitro* and *in vivo*. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(12): 4028–4037.
- [16] Deboer C, Meulman PA, Wnuk RJ, Peterson DH. Geldanamycin, a new antibiotic. *The Journal of Antibiotics*, 1970, 23(9): 442–447.
- [17] Zhang JQ, Liu W, Tan JW, Sun Y, Wan Z, Li RY. Antifungal activity of geldanamycin alone or in combination with fluconazole against *Candida* species. *Mycopathologia*, 2013, 175(3/4): 273–279.

# Isolation, identification and antimicrobial metabolites of *Streptomyces* sp. T12 from termite nest

Pinghua Zhang<sup>1#</sup>, Liping Jin<sup>1#</sup>, Caiping Yin<sup>1</sup>, Jiaqi Chen<sup>1</sup>, Feifei Sun<sup>1</sup>, Zongping Li<sup>2\*</sup>, Yinglao Zhang<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang Province, China

<sup>2</sup> Tobacco Research Institute of Hubei Province, Wuhan 430030, Hubei Province, China

<sup>3</sup> College of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China

**Abstract:** [Objective] To investigate antimicrobial activity and metabolites of *Streptomyces* sp. from the termite nest. [Methods] Antimicrobial activities of fermentation broth against four pathogenic microbes were tested by Oxford cup method. The bioactive strain T12 was identified by molecular biology 16S rRNA sequence analysis. The active metabolites of T12 were isolated and purified from ethyl acetate crude extracts by various chromatographic methods, and their chemical structures were identified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, and their antimicrobial activities were determined by filter paper method. [Results] T12 was identified as *Streptomyces* sp.. Under the concentration of 30 µg/filter paper, the ethyl acetate extract of T12 had potent antibacterial activities against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* with inhibition zone diameters of 20.1 mm and 17.4 mm, respectively. Two metabolites including geldanamycin (**1**) and 17-O-demethylgeldanamycin (**2**), were isolated and characterized from fermentation broth. Both metabolites **1** and **2** exhibited good antimicrobial activity at the concentration of 30 µg/filter paper. The inhibition diameters of compounds **1** and **2** against *S. aureus* were 14.6 mm and 14.5 mm respectively, which were equivalent to those of gentamicin sulfate as positive control. The inhibition diameters of compounds **1** and **2** against *C. albicans* were 10.9 mm and 13.9 mm respectively, which were comparable to those of the referenced amphotericin. [Conclusion] Strain T12 could be potentially developed as a new microbial microbicide.

**Keywords:** nest of *Odontotermes formosanus*, *Streptomyces* sp., metabolites, antimicrobial activities

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770007, 21272215)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. Zongping Li, Tel: +86-27-83606073, E-mail: 2060029324@qq.com; Yinglao Zhang, Tel: +86-551-65786129, E-mail: zhangyl@ahau.edu.cn

Received: 16 April 2020; Revised: 13 August 2020; Published online: 10 November 2020

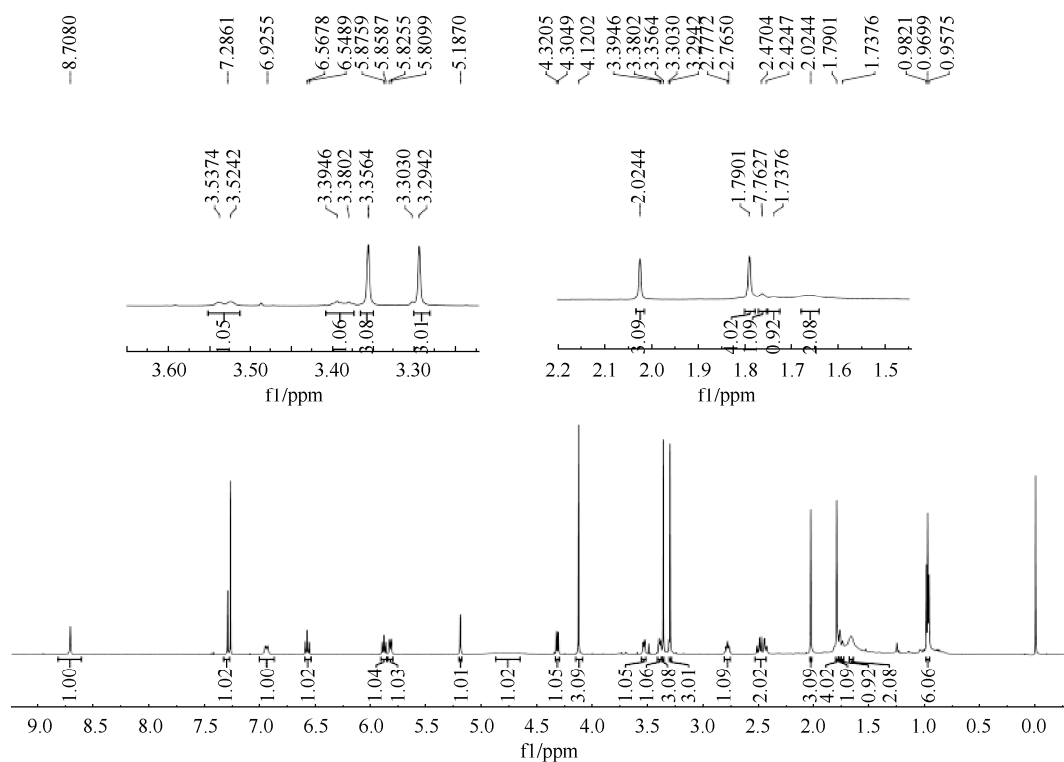


图 S1. 化合物 1 的核磁共振氢谱图

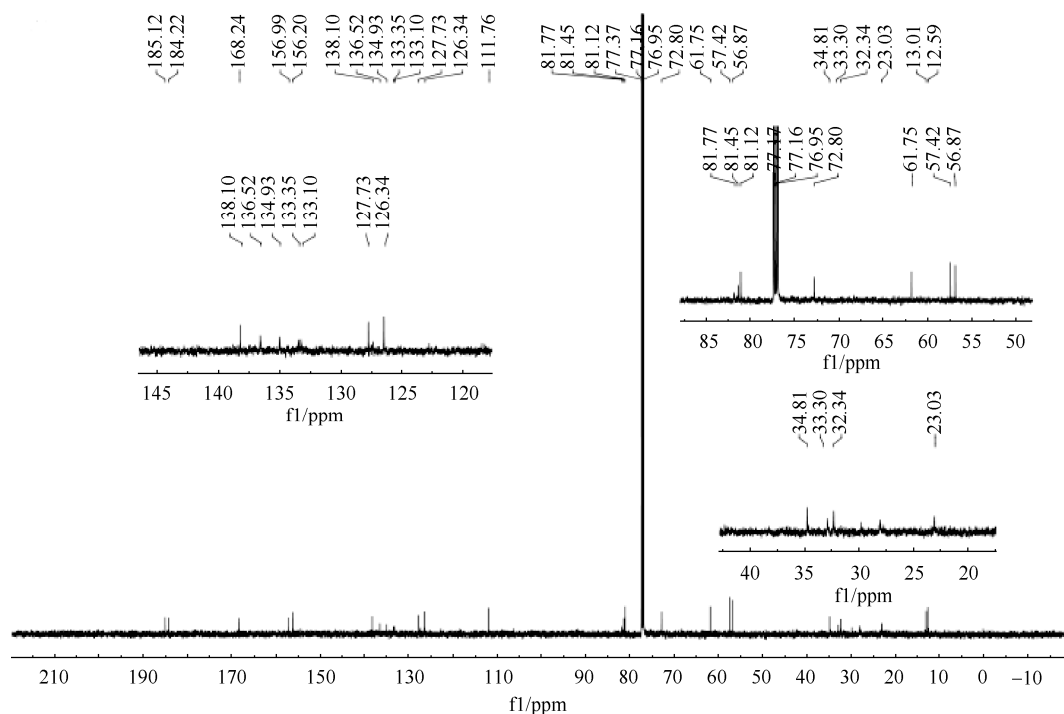
Figure S1.  $^1\text{H}$  NMR of compound 1.

图 S2. 化合物 1 的核磁共振碳谱图

Figure S2.  $^{13}\text{C}$  NMR of compound 1.

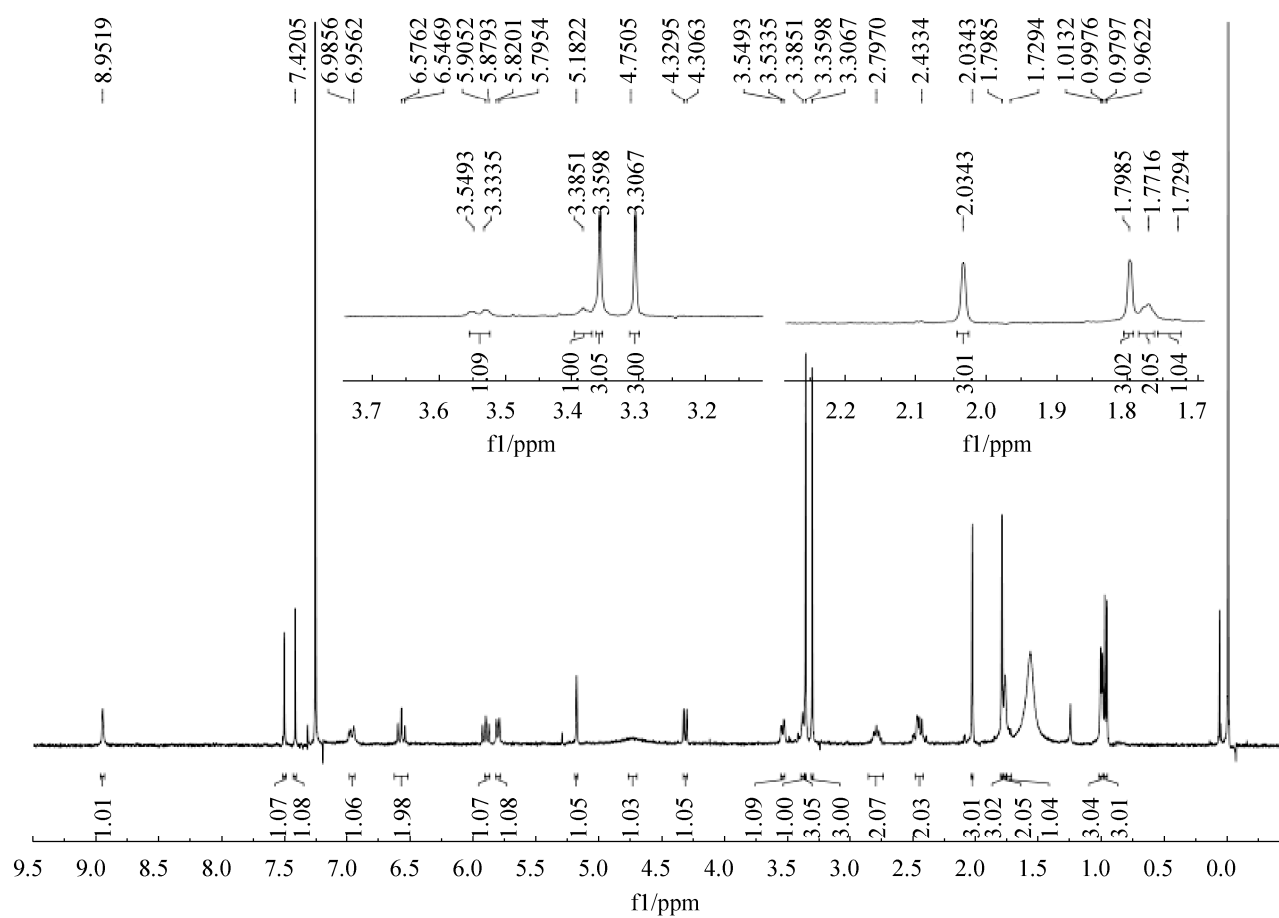


图 S3. 化合物 2 的氢谱图  
Figure S3.  $^1\text{H}$  NMR of compound 2.