

五种动物粪便纯培养放线菌的多样性及生物活性

姜怡¹, 曹艳茹^{1,3}, 韩力², 靳荣线¹, 郑丹², 和文祥³, 李有龙⁴, 黄学石²

¹ 云南大学省微生物研究所, 昆明 650091

² 中国医科大学代谢病及药物开发实验室, 沈阳 110001

³ 西北农林科技大学资源环境学院, 杨陵 712100

⁴ 云南野生动物园, 昆明 650218

摘要: 【目的】以资源利用为出发点,研究了五种动物粪便放线菌的多样性及生物活性。【方法】从云南野生动物园采集5种半野生动物的新鲜粪便样品,用5种培养基分离其中的放线菌,将放线菌鉴定到属,测定纯培养放线菌的抗菌活性,抗肿瘤活性等。【结果】结果表明,所试5种动物粪便放线菌的种类非常丰富,组成各不相同,以链霉菌和微球菌占优势,可能存在大量未知放线菌;粪便放线菌的抗菌活性,抗肿瘤活性,酶活性,分解纤维素、角蛋白的活性非常普遍,尤其是具有抗肿瘤活性的菌株比例较大;产生的具有生物活性的次生代谢产物也是多种多样的。【结论】因此,粪便放线菌与土壤,海洋及植物的放线菌一样,是开发药物、农药和其他产品的重要来源之一,应当加强粪便放线菌的研究和保护利用。

关键词: 放线菌, 多样性, 生物活性, 动物粪便

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 10-1282-08

大量微生物存在于动物肠道,达到 10^{13} 至 10^{14} 数量级,组成了复杂的肠道生态系统^[1]。有的肠道微生物是致病菌,有的则是有益菌,益生菌是重要的代表^[2]。由于人类微生物组计划(Human Microbiome Project, 简称HMP)的实施,动物肠道和粪便微生物(Fecal Microbiota)的研究在一些国家广泛展开^[3]。由于绝大部分肠道微生物仍然未被纯培养^[4],而且很多方法学问题没有解决,微生物和宿主之间形成的十分复杂和动态的生态系统,及其相互关系的机制仍然不知其详^[5]。以前都把与动物和人生长在一起的微生物作为人和动物致病菌看待^[6]。最近的研究表明,微生物对宿主食物的消化、吸收,免疫,抗菌,以及维持宿主的健康起着重要作用^[5,7]。这些作用必然有其物质基础。换言之,

在微生物与其宿主长期协同进化的过程中,微生物是通过产生各种生物活性物质(如抗生素,免疫调节剂,免疫抑制剂,各种维生素,各种酶,酶抑制剂等等)而起作用的;而且这些微生物及其产生的活性物质是微生物与宿主长期互相选择、互相适应、互利互惠、取长补短的结果,它们对宿主本身应该无毒。这等于是在微生物与宿主长期协同进化过程中,进行了至少上亿年的毒性实验,并证明这些活性物质对自己无毒。对于食品和药物开发来说,比较其他来源的微生物,这也许是最为重要的优越性。因此,千方百计把数量巨大的未培养肠道(粪便)微生物变成可培养的微生物,从中寻找药物、农药先导物和其他产品,有可能开辟一条微生物资源利用的新路径。

基金项目: 国家自然科学基金(30900002和81072553); 国家重大专项(2009ZX09302-003); 美国NIH项目(1P41GM086184-01A1)

作者简介: 姜怡(1978-), 德国基尔大学博士, 主要从事放线菌资源研究。E-mail: jiangyikm@hotmail.com

收稿日期: 2012-03-16; **修回日期:** 2012-06-19

当今微生物药物的开发面临非常严重的局面, 第一是包袱沉重, 去重复难度极大, 致使开发周期漫长, 投资巨大。第二是病原菌的抗药性增加很快, 许多过去已经根治的疾病, 如结核病, 现在又卷土重来, 而且不易治疗; 一些地方还不断发现病因不明的新疾病, 往往束手无策; 一些重大、常见的疾病 (如艾滋病, 心血管病, 肿瘤等) 仍然没有良药可治, 而且治疗成本太高。第三, 国内外的研究一致证明, 尽管已经描述、保存了大量微生物, 但仍然有至少 90% (甚至 99%) 的微生物未被纯培养, 但要获得这些未知菌难度很大。为了破解这些难题, 一些学者提出, 新来源, 新菌种, 新基因, 新产物, 新用途的概念, 建议从新产地获得新菌种, 发现新的活性物质^[8-9]。

放线菌是产生天然药物最多的一类微生物。目前临床和农业使用的抗生素有 3/4 是用放线菌生产的。放线菌仍然是新药物开发的重要来源之一, 有人甚至提出“振兴放线菌药物发现”的观点^[10]。在过去进行土壤, 水环境, 极端环境放线菌研究的基础上, 我们选择五种处于半野生状态的高等动物, 采集其新鲜粪便, 分离鉴定纯培养放线菌, 研究其多样性和生物活性, 以期探究一条放线菌资源开发利用的新途径。本文报告部分结果。

1 材料和方法

1.1 样品采集

从昆明市北郊的云南野生动物园选择白眉长臂猿 (*Hylobates hooloc*), 滇金丝猴 (*Rhinopithecus bieti*), 东北虎 (*Panthera tigris altaica*), 小熊猫 (*Ailurus fulgens*) 和大灵猫 (*Viverra zibetha*) 五种动物, 每种动物采集 5-8 只健康个体的新鲜粪便, 混合, 分别放入无菌塑料袋中, 存放于 4℃。重复采集 3 次, 分离其中的放线菌。

1.2 放线菌分离方法

1.2.1 样品预处理: 将样品铺于无菌培养皿, 28℃ 自然干燥 10 d。80℃ 干热处理 60 min。称取 2 g 干样品, 加入 18 mL 0.1% 的 Na_4PO_4 , 220 r/min 震荡提取 1 h。用 10 mL 0.1% 的 Na_4PO_4 进行梯度稀释。

1.2.2 分离培养基: HV 培养基^[11]; ① YIM 171 培养基 (改良甘油-门冬酰胺培养基): 甘油 10 g, 门冬酰胺 1 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g,

CaCO_3 0.3 g, 维生素混合物^[22] 3.7 mg, 微量盐 1 mL, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 50 mg, 琼脂 15 g, pH 7.7; ② YIM 212 培养基 (改良海藻糖-脯氨酸培养基)^[12]; ③ YIM 47 培养基 (改良 LSV-SE 培养基): Na_2HPO_4 0.5 g, KCl 1.7 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CaCl_2 1 g, 大豆粉提取物 0.2 g, 木质素 1 g, 土壤浸汁 100 mL, 维生素混合物^[11] 3.7 mg, pH 7.5; ④ YIM 601 培养基 (淀粉-酪素培养基): 可溶性淀粉 10 g; 酪素 0.3 g; KNO_3 2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g; NaCl 2 g; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 g; CaCO_3 0.02 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 mg; agar 20 g; pH 7.2-7.4。

1.2.3 抑制剂: 制霉菌素 100 mg/L, 萘啶酮酸 20 mg/L, 青霉素 5 mg/L。

1.2.4 分离方法: 平板稀释法。

1.3 菌种鉴定

菌株的细胞培养, DNA 提取, PCR 及 16S rRNA 基因的序列分析按照以前的文献进行^[13]。菌株鉴定到属的水平。

1.4 抑菌实验及 5 类化合物合成基因筛选

菌株用 YIM 61 发酵液 (大豆粉 20 g, 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 4 g, K_2HPO_4 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 1 g, CaCO_3 2 g, 自来水 1000 mL, pH 7.8), 在 28℃、220 r/min 摇瓶发酵 7 天。用琼脂扩散法测试抗菌活性, 用肿瘤细胞株测试抗肿瘤活性。按以前使用的方法筛选聚酮合酶 (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^[14]。氨基-羟基-苯甲酸 (AHBA) 合成酶基因筛选按张会图等的方法进行^[15]。

1.5 水解纤维素和鸡毛实验

按 Shirling 等的方法进行^[16]。

2 结果和讨论

2.1 几种培养基的分离效果

表 1 的结果表明, 淀粉酪素培养基 (YIM 601) 从 5 种动物粪便样品共分离到 79 株放线菌, 改良海藻糖-脯氨酸培养基 (YIM 212) 分离到 66 株。改良甘油-门冬酰胺培养基 (YIM 171) 分离到的放线菌主要是链霉菌。改良 LSV-SE 培养基 (YIM 47) 和 HV 培养基分到的稀有放线菌较多。从东北虎粪便分离到 78 株放线菌, 从大灵猫仅分离到 36 株。总共分离到 304 株放线菌。因为粪便存在大量的革兰氏阴性细

菌,对分离放线菌干扰很大,经过反复实验,一是新鲜样品要在室温风干,80℃干热处理1 h;二是使用制霉菌素100 mg/L,萘啶酮酸20 mg/L,青霉素5 mg/L

这组抑制剂。平板几乎没有真菌出现,细菌也不影响挑菌和计数,效果非常好,建议同行试用。

表1 五种培养基选择性分离5种动物粪便放线菌的效果(分离的纯培养菌株数)

Table 1 Selective isolation effect of actinobacteria from 5 animals feces samples with five media (Amount of strains obtained)

Sample Source	Medium No.					Total
	HV	YIM47	YIM171	YIM212	YIM601	
<i>Hylobates hoolec</i>	19	6	15	11	16	67
<i>Rhinopithecus bieti</i>	11	6	8	15	19	59
<i>Panthera tigris altaica</i>	6	16	16	14	26	78
<i>Viverra zibetha</i>	7	5	7	13	4	36
<i>Ailurus fulgens</i>	12	15	10	13	14	64
Total	55	48	56	66	79	304

2.2 放线菌的组成

白眉长臂猿和滇金丝猴处于动物系统进化上的顶端,前者是杂食类动物,后者是草食类,它们与人类较接近;东北虎属猫科,是肉食动物;大灵猫属灵猫科,杂食;小熊猫属小熊猫科,杂食。从五种动物粪便样品获得304株纯培养菌株按形态和培养特征去重复,留下119株,测定其16S rRNA基因序列,进行系统发育分析,将菌株鉴定到属(表2)。从五种动物粪便一共分离到放线菌20个属,它们是壤球菌属(*Agrococcus*),节杆菌属(*Arthrobacter*),纤维单胞菌属(*Cellulosimicrobium*),棒杆菌属(*Corynebacterium*),短小杆菌属(*Curtobacterium*),肠放线球菌属(*Enteractinococcus*),戈登氏菌属(*Gordonia*),栖白蚁菌属(*Isoptericola*),姜氏菌属(*Jiangella*),考克氏菌属(*Kocuria*),无色杆菌属(*Leucobacter*),黄球菌属(*Luteococcus*),微杆菌属(*Microbacterium*),微球菌属(*Micrococcus*),拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*),厄氏菌属(*Oerskovia*),假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*),红球菌属(*Rhodococcus*),链霉菌属(*Streptomyces*),阎氏菌属(*Yaniella*)。其中微球菌亚目(*Micrococccineae*)有11个属,是种类最多的一个亚目;其次是棒杆菌亚目(*Corynebacterineae*)有3个属;其余丙酸菌亚目

(*Propionibacterineae*),姜氏菌亚目(*Jiangellineae*),假诺卡氏菌亚目(*Pseudonocardineae*),链霉菌亚目(*Streptomycineae*)和链孢囊菌亚目(*Streptosporangineae*)各1个属。从白眉长臂猿获得的纯培养放线菌有节杆菌属等8个属,从小熊猫获得7个属,从滇金丝猴(图1)、大灵猫和东北虎各获得6个属。可见,动物粪便的放线菌组成复杂,而且5种动物之间彼此各不相同。在五种动物粪便样品中,链霉菌都广泛存在,而且数量达到 10^7 (结果未示),在放线菌中属于优势菌群。红球菌属在五种动物也都有分布,过去它们被叫做“嗜粪放线菌”,是动物粪便常见的放线菌。栖白蚁菌属^[17]最早是从白蚁分离到,在土壤也广泛分布。阎氏菌属和姜氏菌属最早都是从土壤获得。这3个属是第一次从高等动物粪便分离到。土壤放线菌以链霉菌属(胞壁I型),小单孢菌属(*Micromonospora*,胞壁II型),链孢囊菌属(胞壁III型)和诺卡氏菌属(*Nocardia*,胞壁IV型)^[18]等菌丝体较发达的成员最为常见^[19]。水生放线菌则以小单孢菌属最占优势^[20]。而动物粪便放线菌除链霉菌外,则以菌丝分化程度较低、杆球状的微球菌亚目最为常见,胞壁IV至X型的菌较多,II、III型的成员较少,这是动物粪便放线菌区系一个最显著的特征。

表2 五种动物粪便纯培养放线菌

Table 2 Composition of actinobacteria from 5 animal feces

Sample Source	Actinobacteria
<i>Hylobates hoolec</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Luteococcus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i>
<i>Rhinopithecus bieti</i>	<i>Cellulosimicrobium</i> , <i>Gordonia</i> , <i>Jiangella</i> , <i>Oerskovia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i>
<i>Panthera tigris altaica</i>	<i>Corynebacterium</i> , <i>Enteractinococcus</i> , <i>Nocardiopsis</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Yaniella</i> , <i>Streptomyces</i>
<i>Viverricula indica</i>	<i>Curtobacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Isoptericola</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i>
<i>Ailurus fulgens</i>	<i>Agrococcus</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Leucobacter</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i>

分离自小熊猫的菌株 YIM 100735、来自大灵猫的菌株 YIM 100784 和来自小熊猫的 YIM 100354, 都属于链霉菌, 分别与已知链霉菌的 16S rRNA 基因序列相似性均低于 96%, 说明它们是新种, 这些菌株正在进行多相分类研究。来自滇金丝猴的 YIM 100199、YIM 100314、YIM 100324 和 YIM 100333 与已知菌的相似性分别是 98.1%、98.0%、98.1% 和

98.3%, 来自小熊猫的 YIM 100358 与已知菌的相似性是 98.0%, 它们是新种可能性大。Cao 等从华南虎 (*Panthera tigris amoyensis*) 发现肠放线球菌新属 (*Enteractinococcus*)^[21], 这次我们又从东北虎分离到这个属的成员。我们认为, 动物粪便存在这类丰富的放线菌, 而且获得未知放线菌的可能性也大。

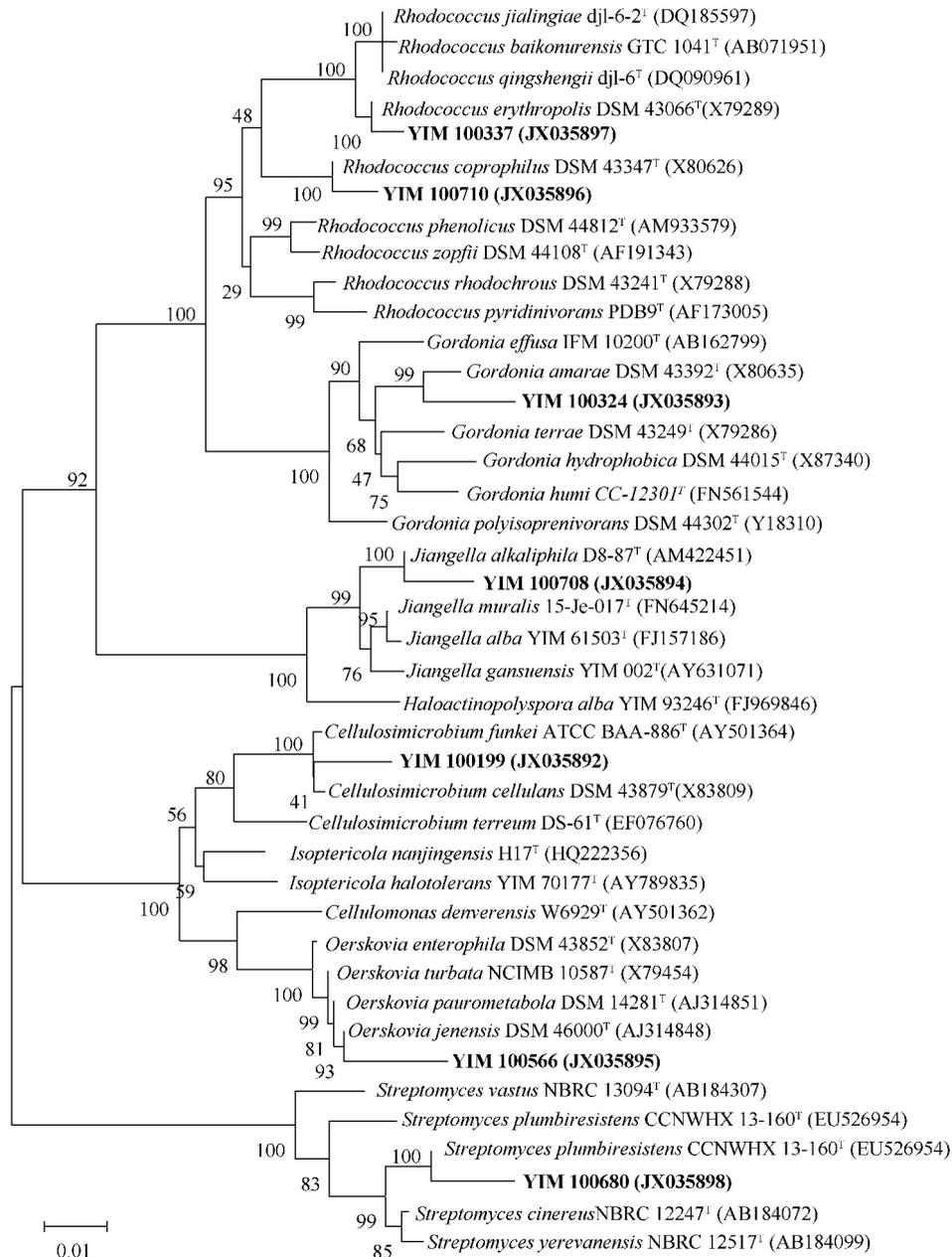


图 1 滇金丝猴粪便可培养放线菌 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic relationships based on 16S rRNA gene sequences of culturable Actinomycetes from feces samples of *Rhinopithecus bieti*. Sequences obtained in this work are in bold. Bootstrap values (expressed as percentages of 1,000 replications) are given at the nodes. Bar, 1 nt substitution per 100 nt.

曹艳茹等从大香格里拉广大地区的森林采集土样,共分离到纯培养放线菌 17 个属^[22]。姜怡等从云南西双版纳热带雨林土壤分离到 26 个属的放线菌,从青海盐碱地区土壤分离到 16 个属的放线菌^[23]。本研究从五种动物粪便就分离到 20 个属的放线菌,说明动物粪便放线菌的多样性也很复杂。

2.3 生物活性

五种动物粪便放线菌对革兰氏阴性细菌、阳性

细菌都有广泛的抗菌活性。来自大灵猫的 25 株放线菌,分别有 15、14 株对枯草杆菌、金黄色葡萄球菌有活性。来自白眉长臂猿、滇金丝猴和大灵猫粪便的菌株对黑曲霉和白色念珠菌有抗菌作用的菌株都在 1/3 以上。来自东北虎的菌株抗菌活性较低。119 株放线菌,仅有 7 株对结核分枝杆菌有活性(表 3)。具有抗菌活性的粪便放线菌比例较高,这是一个有用的结果。

表 3 粪便放线菌的抗菌活性

Table 3 Anti-microbial activities of fecal actinobacteria

Sample Source	Number of test strains	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Hylobates hoolock</i>	26	4	1	1	5	11
<i>Rhinopithecus bieti</i>	29	4	1	1	3	14
<i>Panthera tigris altaica</i>	13	1	0	0	2	0
<i>Viverricula indica</i>	25	15	14	3	6	8
<i>Ailurus fulgens</i>	26	6	6	2	5	3
Total (%)	119	30 (25%)	22 (19%)	7 (6%)	21 (18%)	31 (26%)

从表 4 的初步结果可以看出,来自动物粪便的放线菌,对人慢性髓系白血病细胞株 k562 和人白血病细胞株 HL60 有抑制作用的菌株分别占 52% 和 38%。来自滇金丝猴的 24 株放线菌,有一半以上的菌株对这两种肿瘤细胞株有抑制作用,其中部分菌株的粗提物的 IC₅₀ 低于 4 μg/mL。粗提物的有效成分不到 1%,可见其活性很高。我们曾经专门做过 238 株粪便放线菌的抗肿瘤活性筛选,有至少 30% 的菌株有抗肿瘤活性。可见动物肠道(粪便)放线菌很可能对抑制动物肿瘤病的发生起着十分关键的

作用,这是很有价值的结果。

56 株放线菌筛选 5 类抗生素合成酶基因的结果示于表 5。可见粪便放线菌广泛产生 PKS I, II, NRPS, CYP 和 AHBA 合成酶基因。这也说明为什么粪便放线菌具有广泛的抗菌活性和抗肿瘤活性。

来自动物粪便放线菌广泛具有各种脂肪酶、蛋白酶及糖苷酶活性(资料未示)。107 株来自五种动物的放线菌,有 38% 的菌株能分解纤维素,近 60% 的菌株分解动物羽毛(鸡毛)。可见它们在宿主食物消化、吸收中发挥重要作用(表 6)。

表 4 粪便放线菌的抗肿瘤活性

Table 4 Antitumor activities of fecal actinobacterium strains

Sample Source	k562		HL60	
	Number of test strains	Number of >90% inhibition	Number of test strains	Number of >60% inhibition
<i>Hylobates hoolock</i>	19	12	16	4
<i>Rhinopithecus bieti</i>	24	12	24	13
<i>Panthera tigris altaica</i>	18	8	15	4
Total	61	32 (52%)	55	21 (38%)

表 5 56 株放线菌产生的 5 种化合物的合成酶基因

Table 5 Biosynthesis enzyme genes of five metabolites

Sample Source	Test strain	PKS I	PKS II	NRPS	CYP	AHBA
<i>Hylobates hoolock</i>	12	2	2	3	1	2
<i>Rhinopithecus bieti</i>	9	5	2	3	3	3
<i>Panthera tigris altaica</i>	12	5	1	2	4	2
<i>Viverricula indica</i>	10	1	1	5	0	0
<i>Ailurus fulgens</i>	13	2	3	1	3	1
Total	56	15	9	14	11	8

表 6 粪便放线菌分解纤维素和鸡毛

Table 6 Degradation of chicken feather and cellulose of fecal actinobacteria

Sample Source	Number of test strains	Degradation of cellulose	Chicken feather
<i>Hylobates hoolock</i>	14	1	9
<i>Rhinopithecus bieti</i>	23	5	13
<i>Panthera tigris altaica</i>	19	11	16
<i>Viverricula indica</i>	25	8	12
<i>Ailurus fulgens</i>	26	16	14
Total	107	41 (38%)	64 (60%)

在很长的时间内,都一直把与动物生活在一起的放线菌认为是致病菌^[6]。到目前为止,也没有从放线菌发现具有生物活性的次生代谢产物的报道。我们从东北虎获得的一株链霉菌 YIM 100432 分离到杀假丝菌素 (Candicidin, 来自于 *Streptomyces diastaticus*, *Streptomyces griseus* 等), 格尔德霉素 (Geldanamycin, 来自于 *Streptomyces hygroscopicus* 等), 大黄素 (Emodin, 产自大黄、棕榈等) 芹菜甙元 (Apigenin, 产自芹菜)。大黄素是从植物获得, 对金黄色葡萄球菌、链球菌、白喉杆菌、枯草杆菌、副伤寒杆菌、痢疾杆菌、大肠杆菌、流感杆菌、肺炎球菌、卡他球菌等均有抑制作用; 对临床常见厌氧性细菌有较强的抑制作用抗菌; 而且也是免疫抑制剂, 还有降压作用。芹菜甙元首先从芹菜获得, 具有降压作用。从 YIM 100326 (链霉菌) 获得 AI 77B (来自 *Nocardia* sp., 是用于治疗溃疡的抗生素) 和 Sg17-1-4 (来自未定名的海洋微生物, 有细胞毒性)。合作伙伴从我们分离的一株粪便链霉菌 (YIM 100282) 获得 7 个化合物, 有两个是新化合物, 其中一个命名为 Sannastatin, 属大环内酰胺聚酮糖苷化合物, 具有抗肿瘤活性^[24]。这些初步结果说明, 过去从土壤链霉菌、海洋微生物和植物放线菌的活性物质, 在动物放线菌也能找到; 而且粪便放线菌产生的次生代谢产物不但结构种类繁多, 活性也多种多样。

2.4 结论

从以上结果可以看出, 1. 动物粪便放线菌的种类非常丰富, 而且这 5 种动物的粪便放线菌组成各不相同, 但以链霉菌和微球菌占优势, 可能存在大量的未知放线菌; 2. 粪便放线菌株的抗菌活性, 抗肿瘤活性, 酶活性, 分解纤维素、角蛋白的活性非常普遍, 占的比例大, 尤其是抗肿瘤活性的菌株较多, 活性较高, 这说明放线菌在动物代谢和免疫活动中可能起着重要作用, 搞清这些作用的机制, 对于发掘利用粪

便放线菌资源具有重要意义; 3. 产生的次生代谢产物结构多种多样, 活性广泛。因此, 动物粪便放线菌与土壤、海洋及植物的放线菌一样, 是开发药物、农药和其他产品的重要来源之一, 应当加强粪便放线菌的研究和保护利用。

致谢: 德国哥廷根大学的 H. Laatsch 教授、S. X. Yang 博士, 英国华威大学的 G. L. Challis 教授、L. J. Song 教授分析部分菌株的生物活性物质, 一并致谢; 感谢云南大学省微生物研究所杨春花实验师的帮助和姜成林教授的指导; 感谢云南省野生动物园的邱树妹等工作人员的帮助。

参考文献

- [1] Savage DC. Microbial ecology of gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, 1977, 31:107-133.
- [2] Falagas M, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: A review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58 (2):266-272.
- [3] The Human Microbiome Jumpstart Reference Strains Consortium. A Catalog of Reference Genomes from the Human Microbiome. *Science*, 2010, 328 (5981): 994-999.
- [4] Durso LM, Harhay GP, Smith TPL, Bono JL, DeSantis TZ, Harhay DM, Anderson GL, Keen JE, Laegreid WW, Clawson ML. Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76: 4858-4862.
- [5] Curtis MM, Sperandio V. A complex relationship: the interaction among symbiotic microbes, invading pathogens, and their mammalian host. *Mucosal Immunology*, 2011, 4: 133-138.
- [6] Beman BL. Actinomycete pathogen. In Goodfellow M, Mordarski M and Williams ST (ed.). *The biology of the*

- actinomycetes. London: Academic Press, 1983.
- [7] Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationship in the gut. *Science*, 2001, 292: 1115-1118.
- [8] Jensen PR. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2010, 7:219-224.
- [9] Jiang Y, Cao YR, Wiese J, Lou K, Zhao LX, Imhoff JF, Jiang CL. A new approach of research and development on pharmaceuticals from actinomycetes. *Journal of Life Science US*, 2009, 3(7):52-56.
- [10] Baltz RH. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology*. 2008, 8:1-7.
- [11] 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.
- [12] 姜怡, 段淑蓉, 唐蜀昆, 陈华红, 李文均, 徐丽华. 稀有放线菌的分离方法. *微生物学通报 (Microbiology)*, 2006, 33:181-183.
- [13] Jiang Y, Wiese J, Tang SK, Xu LH, Imhoff JF, Jiang CL. *Actinomycetospira chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Pseudonocardiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58:408-413.
- [14] 曹艳茹, 姜怡, 陈义光, 唐蜀昆, 秦盛, 赵国振, 徐丽华. 武陵山放线菌多样性. *微生物学报 (Acta Microbiol Sinica)*, 2008, 48(7):1-7.
- [15] 张会图, 刘爱明, 武临专, 孙桂芝, 韩锋, 高群杰, 张玉琴, 王以光. AHBA 合酶基因的筛选与放线菌素 D 产生菌的发现. *中国抗生素杂志 (Chinese Journal of Antibiotics)*, 34(1):30-34, 2009.
- [16] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16: 313-340.
- [17] Stackebrandt E, Schumann P, Cui XL. Reclassification of *Cellulosimicrobium variabile* Bakalidou et al. 2002 as *Isoptericola variabilis* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 54: 685-688.
- [18] Lechevalier MP, Lechevalier HA. The chemotaxonomy of actinomycetes. In A. Dietz and DW. Thayer (ed.), *Actinomycete taxonomy*. Special publications No. 6. Arlington: Society for Industrial Microbiology, Va. 1980.
- [19] Jiang CL, Xu LH. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:244-248.
- [20] Xu LH, Jiang CL. A study on diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62:249-253.
- [21] Cao YR, Jiang Y, Jin RX, Han L, He WX, Li YL, Huang XS, Xue QH. *Enteractinococcus coprophilus* gen. nov., sp. nov., of the family *Micrococcaceae* isolated from *Panthera tigris amoyensis* feces, transfer of *Yaniella fodinae* Dhanjal et al. 2011 to the genus *Enteractinococcus* as *Enteractinococcus fodinae* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, ijs. 0.034249-0; published ahead of print January 6, 2012, doi:10.1099/ijs.0.034249-0.
- [22] 曹艳茹, 姜怡, 徐丽华. 大香格里拉土壤放线菌组成分析及生物活性测定. *微生物学报 (Acta Microbiol Sinica)*, 2009, 49(1): 105-109.
- [23] Jiang Y, Cao YR, Zhao LX, Tang SK, Wang Y, Li WJ, Xu P, Lou K, Mao PH, Xu LH. Large numbers of new bacterial taxa found by Yunnan Institute of Microbiology. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56, 709-712.
- [24] Yang SX, Gao JM, Zhang AL, Laatsch H. Sannastatin, a novel toxic macrolactam polyketide glycoside produced by actinomycete *Streptomyces sannanensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, 21, 3905-3908.

Diversity and bioactivity of culturable actinobacteria from animal feces

Yi Jiang^{1*}, Yanru Cao^{1,3}, Li Han², Rongxian Jin¹, Dan Zheng², Wenxiang He³, Youlong Li⁴, Xueshi Huang²

¹ Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China

² Laboratory of Metabolic Disease Research and Drug Development, China Medical University, Shenyang 110001, China

³ College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

⁴ Yunnan Wild Animal Park, Kunming 650218, China

Abstract: [Objectives] In order to provide new source for discovering new lead compounds of drugs and other products, the diversity and some bioactivities of culturable actinobacteria in animal feces were studied. [Methods] Five animals' fecal samples were collected from Yunnan Wild Animal Park. The pure cultures of actinobacteria were isolated from these samples by using 5 different media. The 16S rRNA gene sequences of 119 selected strains were determined; the phylogenetic analysis was carried out; and antimicrobial and anti-tumor activities were determined by using agar diffusion method, tumor cell lines k562 and HL60 respectively. [Results] In total 20 genera of actinobacteria from the 5 animals' feces were identified. Many strains inhibited *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus lentus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Candida albicans* and *Aspergillus niger*. Some strains presented antitumor activities. Some known secondary metabolites and Sannastatin, a novel macrolactam polyketide glycoside with bioactivities, were isolated and identified. [Conclusion] Fecal actinobacteria are a new potential source for discovering drug lead and other industry products.

Keywords: Actinobacteria, diversity, bioactivity, animal feces

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30900002, 81072553), by the National Major Scientific and Technology Special Projects (2009ZX09302-003) and by the National Institutes of Health USA (1P41GM086184-01A1)

* Corresponding author. Tel: +86-871-5034073; Fax: +86-871-5173878; E-mail: jiangyikm@hotmail.com

Received: 16 March 2012/Revised: 19 June 2012

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。