

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54(7):754-759; 4 July 2014

ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.07.005

白蚁巢拮抗放线菌 BYC01 代谢产物的分离和鉴定

卢贻会¹, 李帅¹, 周端瑛¹, 张应烙^{1,2*}

¹浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

²南京大学, 药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093

摘要: 【目的】从白蚁巢中分离出具有抗菌活性的放线菌, 并在其代谢产物中寻找具有抗菌活性的先导化合物。【方法】通过形态学观察和 16S rRNA 序列分析初步确定目标菌株 BYC 01 的分类地位。利用生长速率法和琼脂扩散法测定其代谢产物的抗菌活性。并通过大量发酵提取浸膏, 运用多种色谱方法对发酵产物进行分离、纯化, 利用质谱和核磁共振谱分析鉴定出化合物的结构。【结果】通过形态学观察和 16S rRNA 序列分析, 菌株 BYC 01 被鉴定为紫红链霉菌 (*Streptomyces violaceoruber*)。BYC 01 发酵液不同极性溶剂萃取物的抗菌活性结果表明其有效抑菌物质主要存在于中等极性的乙酸乙酯部位。在供试浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, BYC 01 发酵液乙酸乙酯萃取物对苹果树腐烂病菌具有强烈的抑制作用, 抑制率大于 90%; 对水稻纹枯病菌和杨树溃疡病菌具有较好抑制活性, 抑制率均大于 60%; 在供试浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{滤纸片}$ 时, 与阳性对照相比, 乙酸乙酯提取物对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和水稻白叶枯病菌有中等的抑制作用, 其抑菌圈直径范围为 11.3 mm - 16.5 mm。经质谱和核磁共振谱分析, 从 BYC 01 发酵产物中分离到的单体化合物被鉴定为 fogacin; 在供试浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{滤纸片}$ 时, 化合物 fogacin 对白色念珠菌生长的抑制作用与阳性对照两性霉素相当, 其抑菌圈大小分别为 19.3 mm 和 20.1 mm。【结论】菌株 BYC 01 具有开发为微生物杀菌剂的潜力。

关键词: 白蚁巢, 放线菌, 代谢产物, 抗菌活性

中图分类号: Q935 **文章编号:** 0001-6209(2014)07-0754-06

放线菌是一类重要的微生物资源, 产生的代谢产物表现出众多的生物活性, 其中最早被开发利用的代谢产物为具有抗真菌和抗细菌活性的抗生素。但研究放线菌的对象长期集中于土壤微生物, 相似的环境和反复的研究使得发现新活性或产生新化合

物的放线菌越来越困难。因此, 为了发现新活性或新型天然药物, 研究人员开始把目标转向特境微生物资源。昆虫巢相关微生物是一类研究的较少的特境微生物, 人们从中能发现新活性或新代谢产物, 如 Seon-Hui Park 等报道了从蜚螂粪球分离出的附生

基金项目: 国家自然科学基金(21002092, 21272215); 南京大学医药生物技术国家重点实验室开放课题(01KF-201411)

* 通信作者。Tel: +86-579-82286419; E-mail: ylzhang@zjnu.cn

作者简介: 卢贻会(1991-), 女, 湖南人, 硕士研究生, 主要研究天然药物化学。E-mail: lyh910208@sina.com

收稿日期: 2013-10-24; ; **修回日期:** 2014-01-16

菌 *Streptomyces* sp. 能产生具有生物活性的新化合物 tripartin、coprismycins A 和 B, 以及新骨架化合物 tripartilactam^[1-3]。当前, 尚未见人们对白蚁巢相关微生物活性及其代谢产物的报道。本实验拟对一株具有抗菌活性的白蚁巢放线菌进行鉴定并明确其活性成分, 旨在为开发新型微生物源杀菌剂奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集: 黑翅土白蚁巢于 2011 年 12 月采自浙江省兰溪市。

1.1.2 供试致病菌: 苹果树腐烂病菌 (*Valsa mali*)、杨树溃疡病菌 (*Dothiorella gregaria*)、番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*)、小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、苦瓜枯萎病菌 (*Fusarium semitectum*)、水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*) 等 9 种致病真菌。水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等 4 种致病细菌。

1.1.3 培养基: 高氏 1 号培养基; 牛肉膏蛋白胨培养基; 麦芽浸汁培养基 (MEA 培养基)。

1.1.4 主要仪器和试剂: 超净工作台、高压灭菌锅、恒温培养振荡器、旋转蒸发仪、电子分析天平、PCR 反应扩增仪 (加拿大 BBI 公司)、SW-CJ-1D 洁净工作台 (江苏苏洁净化设备厂)、DK-8D 型电热恒温水槽 (上海森信实验仪器有限公司)、DYY-8 型稳压稳流电泳仪 (上海琪特分析仪器有限公司)、YXJ-2 离心机 (湘仪离心机仪器有限公司)、H6-1 微型电泳槽 (上海精益有机玻璃制品仪器厂)、移液枪 (加拿大 BBI 公司); NaCl、蛋白胨、可溶性淀粉、牛肉膏、蔗糖、琼脂粉等购自北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.2 BYC 01 菌株的鉴定

1.2.1 形态学鉴定: 将 BYC 01 接种于高氏 1 号培养基中, 30℃ 培养, 观察菌落的外部形态特征。并用插片法观察该菌的孢子丝形态。

1.2.2 分子生物学鉴定: 将培养好的 BYC 01 新鲜

菌体作为 DNA 提取的材料, 按照生工 SK1201-UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取。使用通用引物 1540 r 和 7 f, 进行 PCR 扩增反应。PCR 反应程序: 94℃ 2 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 5 min。将 PCR 产物纯化后送往上海生工公司测序。测序结果进行 BLAST 比对分析, 选取相似序列, 利用 MEGA 5.05 软件构建系统发育树。

1.3 BYC 01 发酵及产物的提取

将已活化的菌接入装有 150 mL 高氏 1 号培养基的 250 mL 的三角瓶中, 30℃、150 r/min 的条件下, 培养 3 d 作为种子液; 再接入到装有 500 mL 高氏 1 号培养基的 1000 mL 的三角瓶中 (每瓶约 5 mL 种子液), 30℃、150 r/min 的条件下, 摇床发酵 7 d, 共发酵 20 L。所得发酵液在室温下经 3 层纱布过滤, 滤液用乙酸乙酯萃取 3 次, 萃取液经减压浓缩得到粗浸膏。

1.4 BYC 01 发酵液不同极性物质的提取

将 BYC 01 的发酵滤液依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇萃取, 萃取液经减压浓缩依次得到石油醚提取物、乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物。

1.5 抗菌活性的测定

参照文献 [4] 中的生长速率法测定 BYC 01 发酵液不同极性溶剂萃取物对植物致病真菌的抗菌活性。含有 BYC 01 不同极性提取物的培养基制备: 将提取物溶于丙酮, 配成浓度为 1 mg/mL 的母液。分别吸取 1 mL 母液与 9 mL MEA 培养基于无菌试管中, 充分振摇后倒入无菌培养皿中, 使培养基中提取物的最终质量浓度为 100 μg/mL, 以等量丙酮作为空白对照。将活化的植物致病真菌用无菌打孔器打成直径为 5 mm 的菌块, 置于上述培养基, 每处理重复 3 次, 培养 3-7 d 后, 采用十字交叉法测量供试菌菌落直径。按如下公式计算抑制率: 抑制率 = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 5 mm)] × 100%。

参照文献 [5] 采用琼脂扩散法测定发酵液提取物和单体化合物对白色念珠菌和 4 种致病细菌的抑制活性。将所有供试菌接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 大肠杆菌于 37℃, 其它供试菌于 28℃, 150 r/min, 恒温摇床培养 1-2 d 活化。将上述供试菌充分稀释至菌悬液浓度为 1.5×10^8 cfu/mL, 并均匀涂布在牛肉膏蛋白胨培

培养基上。用移液枪吸取5 μL 药液滴加到直径为7 mm的无菌滤纸片上,待溶剂挥干后放入上述制备好的培养基中,置于28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养1-2 d,观察是否产生抑菌圈,并采用十字交叉法测量抑菌圈的直径。重复2次,同时以两性霉素作为白色念珠菌的阳性对照,硫酸庆大霉素作为供试细菌的阳性对照。

1.6 BYC 01 活性物质的分离与结构鉴定

乙酸乙酯粗提物经薄层层析、硅胶柱层析、ODS柱层析等色谱方法分离、纯化,得到纯的单体化合物。用Mariner System 5304质谱仪测定单体化合物的分子量。用Bruker AVANCE-400 MHz核磁共振仪对活性物质的 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱进行分析。

2 结果和分析

2.1 BYC 01 菌株的鉴定

2.1.1 形态学鉴定:在高氏1号培养基上,菌落边缘白色,中间初为红色,随后颜色逐渐变深直至紫色;干燥,质地紧密,紧贴培养基生长,不易挑起。镜检发现孢子丝分枝,形成圈数不等的螺旋。

2.1.2 分子生物学鉴定:通过测序,可知该菌16S rRNA的序列长度为1398 bp。在NCBI上通过BLAST比对,BYC 01菌株与链霉菌属*Streptomyces violaceoruber* 同源性高达100%,在系统发育树上属于同一支。结合形态学特征,将菌株BYC 01鉴定为紫红链霉菌(*S. violaceoruber*)。

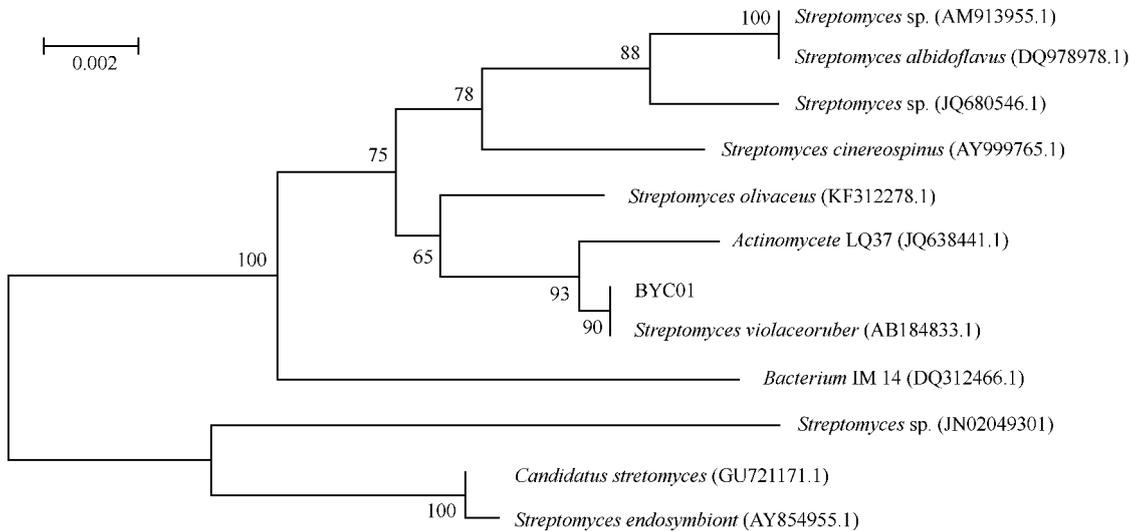


图1. 基于16S rRNA基因序列构建的菌株BYC 01与链霉菌属相关菌株之间的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of BYC 01 and *Streptomyces* related strains.

Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The scale bar represents 0.002 nucleotide changes per position.

2.2 BYC 01 提取物对致病菌的生长抑制作用

BYC 01提取物对植物致病真菌的生长抑制作用见表1。从表中数据可知,在供试浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,BYC 01发酵液提取物的乙酸乙酯相对苹果树腐烂病菌具有强烈的抑制作用,抑制率大于90%;对水稻纹枯病菌和杨树溃疡病菌也有较好的抑制作用,抑制率均大于60%;石油醚相和正丁醇相则较弱,抑制率均小于50%。因此,BYC 01发酵液的有效抑菌活性物质主要集中在中等活性的乙酸

乙酯部位。

BYC 01提取物对白色念珠菌和4种致病细菌的生长抑制作用见表2。从表中数据可看出,在供试浓度为30 $\mu\text{g}/\text{滤纸片}$ 时,与阳性对照相比,乙酸乙酯提取物对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和水稻白叶枯病菌有中等的抑制作用,其抑菌圈直径范围为11.3 mm-16.5 mm;而正丁醇提取物对供试菌的抑制作用较弱,其抑菌圈直径范围为6.6 mm-11.3 mm。

表 1. BYC 01 发酵液不同极性提取物对 8 种植物致病真菌的生长抑制作用

Table 1. Inhibiting effect of BYC 01 different polar extracts on eight plant pathogens

phytopathogens	petroleum ether extract		ethyl acetate extract		butanol extract		CK
	a	b	a	b	a	b	a
<i>V. mali</i>	19.5 ± 1.1	44.7 ± 1.1	6.8 ± 0.6	93.1 ± 0.8	30.8 ± 1.2	1.5 ± 1.5	31.2 ± 0.8
<i>R. solani</i>	26.4 ± 1.1	36.5 ± 0.9	16.9 ± 0.8	64.7 ± 0.0	34.3 ± 1.0	13.1 ± 0.6	38.7 ± 0.8
<i>D. gregaria</i>	21.0 ± 0.6	45.8 ± 0.0	16.8 ± 0.4	60.0 ± 0.7	26.1 ± 1.0	28.5 ± 1.4	34.5 ± 0.6
<i>F. oxysporum</i>	24.9 ± 1.6	13.5 ± 1.7	22.4 ± 1.1	24.3 ± 3.9	24.0 ± 0.7	17.4 ± 5.7	28.0 ± 2.0
<i>F. graminearum</i>	28.4 ± 1.3	4.1 ± 1.6	24.8 ± 0.5	18.9 ± 4.9	26.4 ± 1.3	12.3 ± 1.6	29.4 ± 1.7
<i>A. solani</i>	30.8 ± 2.5	1.9 ± 1.1	26.9 ± 3.3	16.7 ± 1.9	28.3 ± 0.5	11.4 ± 8.7	31.3 ± 2.8
<i>F. semitectum</i>	24.9 ± 0.8	13.5 ± 2.2	22.4 ± 1.6	24.3 ± 0.7	24.0 ± 0.9	17.4 ± 1.9	28.0 ± 1.4
<i>M. oryzae</i>	26.8 ± 0.6	6.8 ± 6.0	26.3 ± 1.8	9.0 ± 0.9	26.9 ± 2.6	6.4 ± 2.7	28.4 ± 2.0

"a" means colony average diameter/mm; "b" means inhibiting rate/%; CK means blank control; the concentration of crude extract is 100 μg/mL.

表 2. BYC 01 发酵液不同极性提取物对白色念珠菌和 4 种致病细菌的生长抑制作用的抑菌圈直径 (mm)

Table 2. Inhibition zone diameter of inhibiting effect of BYC 01 different polar extracts on *C. albicans* and four pathogenic bacteria (mm)

pathogens	ethyl acetate extract	butanol extract	gentamycin sulfate	amphotericin
<i>C. albicans</i>	14.8 ± 0.8	11.3 ± 0.8	-	20.1 ± 0.7
<i>S. aureus</i>	14.0 ± 1.0	7.9 ± 0.3	21.4 ± 1.6	-
<i>E. coli</i>	14.0 ± 1.0	6.6 ± 0.3	23.3 ± 0.5	-
<i>B. subtilis</i>	16.5 ± 1.0	11.8 ± 0.8	29.1 ± 1.0	-
<i>X. oryzae</i>	11.3 ± 0.8	8.0 ± 0.5	23.9 ± 1.0	-

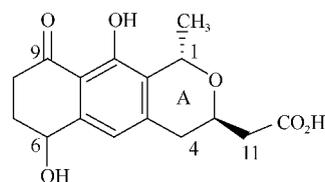
Gentamycin sulfate and amphotericin as the positive control of pathogenic bacteria and *C. albicans* respectively; the concentration for the test is 30 μg/filter paper.

2.3 BYC 01 活性物质的分离与结构鉴定

20L 发酵液过滤后的滤液, 乙酸乙酯萃取、浓缩得粗浸膏 20.7 g, 用硅胶 (210 g, 200-300 目) 柱层析分离, 以二氯甲烷-甲醇梯度洗脱 (100% 二氯甲烷 → 100% 甲醇) 得到 7 个馏分 (F1: 2.3 g, F2: 2.4 g, F3: 2.8 g, F4: 6.5 g, F5: 2.6 g, F6: 1.8 g, F7: 1.2 g)。生物活性测试发现 F4 (二氯甲烷: 甲醇为 100:4) 活性最好, 馏分 F4 经 ODS 柱 (填充物: Cosmosil 40C₁₈-PREP) 分离, 40% 甲醇洗脱得 10 个馏分 (F4-1: 0.6 g, F4-2: 0.7 g, F4-3: 0.8 g, F4-4: 0.8 g, F4-5: 0.6 g, F4-6: 0.5 g, F4-7: 0.6 g, F4-8: 0.4 g, F4-9: 0.4 g, F4-10: 0.3 g), 馏分 F4-3 至 F4-6 合并, 重结晶方法得到了 1 个单体物质 (15 mg)。对该单体化合物进行质谱和核磁共振谱分析, 其数据如下:

ESI-MS: m/z 305 $[M-H]^-$ ($C_{16}H_{17}O_6$ 305.10251), 611 $[2M-H]^-$, 1H -NMR (CD_3OD) δ 6.85 (1H, s, 5-H), 5.06 (1H, q, $J = 6.5$ Hz, 1-H), 4.8 (11H, dd, $J_{7a,b} = 8.0, 3.5$ Hz, 6-H), 4.41 (1H, m, 3-H), 2.87 (1H, ddd, $J_{7a,b;8a} = 17.0, 9.0, 4.5$ Hz, 8-H_b), 2.85 (1H, m, 4-H_b), 2.67 (1H, m, 4-H_a), 2.65 (1H, ddd, $J_{7a,b;8a} = 17.5, 9.0, 4.5$ Hz, 8-

H_a), 2.56 (2H, m, 11-H₂), 2.27 (1H, m, 7-H_b), 2.09 (1H, m, 7-H_a), 1.54 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, 13-H₃); ^{13}C -NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ : 206.1 (s, C-9), 175.5 (s, C-12), 159.8 (s, C-10), 146.0 (s, C-5_a), 143.6 (s, C-4_a), 127.5 (s, C-10_a), 119.1 (d, C-5), 114.5 (s, C-9_a), 69.4 (d, C-1), 68.2 (d, C-6), 65.2 (d, C-3), 42.5 (t, C-11), 35.9 (t, C-8), 35.4 (t, C-4), 32.7 (t, C-7), 19.3 (q, C-13)。上述数据与文献报道的 fogacin 基本一致^[6]。因此, 确定该化合物为 fogacin, 具体的分子结构^[6]如图 2 所示。

图 2. Fogacin 结构图^[6]Figure 2. Molecular structure of fogacin^[6].

2.4 化合物 fogacin 对白色念珠菌和致病细菌的生长抑制作用

化合物 fogacin 对白色念珠菌和 4 种致病细菌的生长抑制作用见表 3。从表中数据可知, 在供试

浓度为 30 μg /滤纸片时,该化合物对白色念珠菌的抑制作用与阳性对照两性霉素相当,抑菌圈直径分别为 19.3 mm 和 20.1 mm;与阳性对照硫酸庆大霉素相比,化合物 fogacin 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和水稻白枯病菌有较好的抑制作用,其抑菌圈直径范围为 13.5 mm - 21.9 mm。因化合物量少,未测试其对植物致病真菌的活性。

表 3. Fogacin 对白色念珠菌和 4 种致病细菌生长抑制作用的抑菌圈直径 (mm)

Table 3. Inhibition zone diameter of inhibiting effect of fogacin on *C. albicans* and four pathogenic bacteria (mm)

pathogens	fogacin	gentamycin	amphotericin
<i>C. albicans</i>	19.3 \pm 0.5	-	20.1 \pm 0.7
<i>S. aureus</i>	16.5 \pm 0.7	21.4 \pm 1.6	-
<i>E. coli</i>	13.5 \pm 0.8	23.3 \pm 0.5	-
<i>B. subtilis</i>	21.9 \pm 0.3	29.1 \pm 1.0	-
<i>X. oryzae</i>	14.8 \pm 1.3	23.9 \pm 1.0	-

Gentamycin sulfate and amphotericin as the positive control of pathogenic bacteria and *C. albicans* respectively; the concentration for the test is 30 μg /filter paper.

3 讨论

本研究从黑翅土白蚁巢中筛选到 1 株具有较好抗菌活性的菌株 BYC 01,并对其菌株鉴定及活性代谢产物进行了研究。经形态学观察和 16S rRNA 序列分析该菌株被鉴定为 *S. violaceoruber*。活性测试表明 BYC 01 的乙酸乙酯萃取物对苹果树腐烂病菌、水稻纹枯病菌和杨树溃疡病菌具有较好的抗菌活性;对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和水稻白叶枯病菌也有中等的抑制活性;采用活性跟踪方法从其发酵液粗浸膏中分离得到 1 个单体化合物 fogacin,该化合物对白色念珠菌有很好的抑制活性,对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和水稻白叶枯病菌也具有中等的抑制活性。虽有报道 *S. violaceoruber* 具有杀钉螺的效果^[7-8],但尚未见抑菌活性的报道。因此,菌株 BYC 01 具有开发为微生物杀菌剂的潜力,值得深入研究。至于该菌的安全性、活性作用机理以及其它活性化合物的分离等,还有待于进一步的研究探讨。

参考文献

[1] Kim SH, Kwon SH, Park SH, Lee JK, Bang HS, Nam SJ, Kwon HC, Shin J, Oh DC. Tripartin, a histone

demethylase inhibitor from a bacterium associated with a dung beetle larva. *Organic Letters*, 2013, 15 (8) : 1834-1937.

- [2] Kim SH, Ko H, Bang HS, Park SH, Kim DG, Kwon HC, Kim SY, Shin J, Oh DC. Coprismycins A and B, neuroprotective phenylpyridines from the dung beetle-associated bacterium, *Streptomyces* sp.. *Bioorganic Medicina Chemistry Letters*, 2011, 21 (5) : 5715-5718.
- [3] Park SH, Moon K, Bang HS, Kim SH, Kim DG, Oh KB, Shin J, Oh DC. Tripartilactam, a cyclobutane-bearing tricyclic lactam from a *Streptomyces* sp. in a dung beetle's brood ball. *Organic Letters*, 2012, 14 (5) : 1258-1261.
- [4] Zhang YL, Kong LC, Jiang DH, Yin CP, Cai QM, Chen Q, Zheng JY. Phytotoxic and antifungal metabolites from *Curvularia* sp. FH01 isolated from the gut of *Atractomorpha sinensis*. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (3) : 3575-3577.
- [5] Nong X, Zhang X, Chen Y, Qi S. Alkaloids from gorgonian-derived *Streptomyces* sp. SCSGAA0009 and their antibacterial and antilarval activities. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (9) : 995-1000. (in Chinese)
- 农旭华, 张晓勇, 陈茵, 漆淑华. 柳珊瑚共附生放线菌 *Streptomyces* sp. SCSG A40009 中生物碱类化合物及抗菌和抗附着活性. *微生物学报*, 2013, 53 (9) : 995-1000.
- [6] Radzom M, Zeeck A, Antal N, Fiedler HP. Fogacin, a novel cyclic octaketide produced by *Streptomyces* strain Tü 6319[†]. *The Journal of Antibiotics*, 2006, 59 (5) : 315-317.
- [7] Yang J, Xiao R, Yang G. Study on the snail-killing results of *Streptomyces violaceoruber*. *Journal of Hubei University (Natural Science Edition)*, 2004, 26 (4) : 341-343. (in Chinese)
- 杨建明, 肖瑞芬, 阳桂芬. 紫红链霉菌杀钉螺效果初报. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2004, 26 (4) : 341-343.
- [8] Ma A, Zhang Y, Ke W, Ni H. Molluscicidal efficacy of three kinds of plants mixed with *Streptomyces violaceoruber* against snail *Oncomelania hupensis*. *Chinese Journal of Ecology*. 2009, 28 (1) : 158-161. (in Chinese)
- 马安宁, 张云, 柯文山, 倪红. 三种植物与紫红链霉菌组合灭菌效果. *生态学杂志*, 2009, 28 (1) : 158-161.

Isolation and identification of termitarium antagonistic actinomycetes BYC 01 and its active metabolites

Yihui Lu¹, Shuai Li¹, Duanxu Zhou¹, Yinglao Zhang^{1,2*}

¹College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang Province, China

²State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] We isolated actinomycetes from the termitarium and studied its metabolites to find the antimicrobial compounds. [Methods] We determined the taxonomic status of target strain BYC 01 by morphological observation and 16s rRNA sequence analysis. Growth rate method and agar disc diffusion assays were used to test the antimicrobial activities. Fermentation product was isolated and purified by various chromatographic methods, and the structure was determined by mass spectrum and nuclear magnetic resonance analyses. [Results] BYC 01 was identified as *Streptomyces violaceoruber*. The main antimicrobial ingredients of BYC 01 fermentation broth consisted in the ethyl acetate fraction of moderate polar part. The ethyl acetate extract of BYC 01 had strong antifungal activities against *Valsa mali* with inhibition rate of more than 90%, and activities against *Rhizoctonia solani* and *Dothiorella gregaria* with inhibition rate of more than 60% under the concentration of 100 µg/mL. Furthermore, the extract showed the intermediate antimicrobial activities against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Xanthomonas oryzae* with the mean halo diameters ranging from 11.3 to 16.5 mm under the concentration of 30 µg/filter paper. A monomer compound was purified from the fermentation products, and was identified as fogacin on the basis of mass spectrum and nuclear magnetic resonance analyses. The compound fogacin and the positive control had similar antimicrobial activities against *C. albicans* with inhibition zone of 19.3 mm and 20.1 mm under the concentration of 30 µg/filter paper. [Conclusion] Strain BYC 01 could be potentially developed as a new antimicrobial agent.

Keywords: termitarium, actinomycetes, metabolites, antimicrobial activities

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21002092,21272215) and by the Open Project of Nanjing University, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology (01KF-201411)

* Corresponding author. Tel: +86-579-82286419; E-mail: ylzhang@zjnu.cn

Received: 24 October 2013 / Revised: 16 January 2014