

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(11):1485-1494; 4 November 2015
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20150072

肇庆星湖湿地可培养放线菌多样性

薛冬^{1,2}, 赵国振², 姚青³, 赵海泉^{1*}, 朱红惠^{2*}

¹安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 210095

²广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070

³华南农业大学园艺学院, 广东 广州 510642

摘要:【目的】探究星湖湿地可培养放线菌物种多样性, 筛选潜在药源活性代谢产物产生菌, 为后续菌种资源开发奠定基础。【方法】采用5种选择性分离培养基分离星湖湿地底泥中的放线菌, 通过16S rRNA基因同源性分析代表性菌株的物种多样性; 以3株病原细菌为指示菌检测分离菌株的抑菌活性; PCR扩增代表菌株的聚酮合酶(PKS I、PKS II)基因、非核糖体多肽合成酶(NRPS)基因、安莎类化合物(AHBA)基因及3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶(HMGA)基因。【结果】分离到135株放线菌菌株, 被鉴定为放线菌纲的7个目、10个科、13个属, 优势类群为链霉菌、小单孢菌及诺卡氏菌。83株检测菌中, 24.09%抗金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 4.8%抗大肠杆菌(*Escherichia coli*); 24株高活性菌株中PKS I阳性率16.7%, PKS II阳性率62.5%, NRPS阳性率16.7%, AHBA阳性率12.5%, HMGA阳性率29.2%。活性复筛及HPLC结果显示, 菌株XD007、XD114和XD128显著抑制3株病原指示菌, 且能产生大量次级代谢产物。【结论】星湖湿地底泥中放线菌资源丰富, 筛选到的活性菌株可用于后续药源活性次级代谢产物的分离。

关键词:放线菌, 多样性, 功能基因, 活性筛选

中图分类号:Q939 **文章编号:**0001-6209(2015)11-1485-10

放线菌是抗生素和其他生物活性物质的主要来源, 目前已发现的近万种抗生素, 约70%是由放线菌产生^[1-2], 如链霉素、阿维霉素、井冈霉素等, 为人类的生产、生活做出了巨大贡献。另一方面, 病毒引发的传染性疾病(艾滋病、禽流感、SARS), 遗传性疾病(糖尿病、痛风等)、病原菌的耐药性等一系列新问题严重影响或危害了人类健康。解决这一系列新问题的办法之一就是大量寻找和发现新的生物活性

物质。作为获得先导化合物的基础和源泉, 菌株资源的获取至关重要, 在对陆地菌株资源研究的基础上人们将目光投向了特殊生境, 如海洋、湿地、植物内生、高温热泉、盐湖、极地等。高盐度、高压、低温、低营养及共附生关系等特殊环境, 造就了放线菌独特的代谢方式和代谢产物, 是寻找新型活性次级代谢产物的重要资源。

被誉为“地球之肾”的湿地生态系统, 是地球生

基金项目:国家自然科学基金(31300011); 广东省科技基础条件建设项目(2013B060400043); 广东省科学院优秀青年科技人才基金项目(rcjj201301); 广东省微生物研究所南粤微生物优秀人才培养基金项目

* 通信作者。Tel: +86-551-65786059; E-mail: swjs12@ahau.edu.cn

作者简介:薛冬(1991-), 男, 安徽六安人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物多样性研究。E-mail: xue_dong_kevin@126.com

收稿日期:2015-02-09; **修回日期:**2015-05-08

态环境的重要组成部分,对人类生产、生活和自然生态系统循环具有重要价值。微生物作为湿地系统重要组成部分,参与湿地生态系统的物质循环和能量流动;湿地中蕴藏着丰富的微生物资源,不同类型湿地系统中,微生物群落结构差异较大^[3]。研究显示,湿地生态系统中蕴藏着丰富的微生物资源^[3-4],放线菌作为一类重要的类群广泛的存在于多种湿地环境之中,如芦苇湿地^[5],人工湿地^[6],高原淡水沼泽湿地^[7-8],高寒湿地^[9],红树林湿地^[10-12]等。

广东星湖湿地是我国第一个国家湿地自然保护区和中国第一批世界生物圈保护区,地处广东省中西部,岩溶地貌景观独特,湖中有七座溶岩山峰错落分布,是我国亚热带最具典型性和代表性的岩溶湖泊湿地。特殊的地理位置和亚热带季风气候及丰富多样的生态环境不仅造就了星湖湿地特殊的地貌形态也为该区域的微生物提供了特殊的栖息地。我们前期采用 PCR-DGGE 的方法发现星湖湿地具有丰富的放线菌类群^[13]。为此,本研究试图从星湖湿地

底泥中分离可培养放线菌菌株,并对分离菌株进行抗菌活性筛选及功能基因检测,以期放线菌生物资源的开发和利用及新药开发研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 样品采集

本研究所用底泥于 2013 年 10 月,从广东肇庆星湖湿地 26 个样点使用自制柱状采样器采集,取样深度为 50 - 150 cm,样品采集后装于无菌采样袋,运抵实验室后保存在 4℃ 冰箱。取样品于无菌皿中,干燥 7 - 10 d,粉碎后过 0.2 mm 筛子,装入无菌袋中备用。

1.2 培养基

1.2.1 分离培养基:见表 1。

1.2.2 纯化培养基 (ISP2) (g/L):酵母粉 4.0,麦芽浸出粉 10.0,葡萄糖 4.0,琼脂 20.0, pH7.2。

1.2.3 发酵培养基:见表 2。

表 1. 用于分离星湖湿地底泥放线菌的 5 种分离培养基的组成成分

Table 1. Compositions of the selected 5 kinds of media used for isolation of actinobacteria from Xinghu wetland sediments

Medium	Compositions/(g/L)
M1	Starch 20.0, KNO ₃ 1.0, K ₂ HPO ₄ 0.5, NaCl 0.5, FeSO ₄ 0.01, Agar 20.0, pH7.2
M2	Glycerin 10.0, Asparagine 1.0, K ₂ HPO ₄ ·H ₂ O 1.0, MgSO ₄ ·H ₂ O 0.5, CaCO ₃ 0.3, Multivitamins 5 mg, Trace salt solution 100 μL, Agar 20.0, pH7.2
M3	Yeast extract powder 4.0, Malt extract powder 10.0, Glucose 4.0, Agar 20.0, pH7.2
M4	Starch 10.0, Casein 0.3, KNO ₃ 2.0, NaCl 2.0, CaCO ₃ 0.2, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.005, Agar 20, pH7.2
M5	Peptone 0.5, Starch 0.5, Glucose 0.5, Yeast extract 0.5, Casein hydrolysis 0.5, Agar 20, pH7.2

Multivitamins: Lactochrome 100 mg, Niacin 100 mg, Calcium pantothenate 100 mg, Inose 100 mg, Biotin 50 mg, P-Aminobenzoic Acid 100 mg, Vitamin B₁ 100 mg, Vitamin B₆ 100 mg; Trace salt solution: FeSO₄·7H₂O 0.1 g, MnCl₂·4H₂O 0.1 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, ddH₂O 1000 mL.

表 2. 星湖湿地底泥放线菌 5 种发酵培养基组成成分

Table 2. Compositions of the 5 types of fermentation media used by actinobacteria isolated from Xinghu wetland sediments

Medium	Compositions/(g/L)
F1	Millet 10.0, Glucose 10.0, Peptone 5.0, NaCl 2.5, CaCO ₃ 0.5, (NH ₄) ₂ SO ₄ 1.0
F2	Starch 10.0, Glucose 10.0, Peptone 5.0, Yeast 5.0, NaCl 4.0, K ₂ HPO ₄ 0.5, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5, CaCO ₃ 2.0, pH7.2
F3	Soybean powder 5.0, Mannitol 10.0, pH7.2
F4	Glucose 20.0, Peptone 5.0, Yeast extract powder 1.0, Beef extract 3.8, NaCl 1.9, CaCO ₃ 0.47, pH7.2
F5	Sucrose 30.0, NaNO ₃ 3.0, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.5, K ₂ HPO ₄ 1.0, KCl 0.5, FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.005, pH7.2

1.2.4 指示菌培养基: LB 培养基。组成如下 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 琼脂 20, pH7.2。

1.3 指示菌

大肠杆菌 (*Escherichia coli* GIM1.442), 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* GIM1.441), 沙门氏菌 (*Salmonella* sp. GIM1.237) 为广东省微生物研究

所菌种保藏中心保藏菌株。

1.4 湿地放线菌分离、保存及初步鉴定

采用干热法^[14]预处理样品,取 10 g 样品在 110 °C 处理 10 min,然后加入到含有 1.5% 苯酚, 0.5% Tween 80, 0.5% Na₄P₂O₇ 的 90 mL 溶液中,在 150 r/min 下振荡 3 h,梯度稀释到 10⁻⁴ 进行涂布, 28 °C 培养 14 - 35 d,挑取单菌落,纯化,培养。5 种

分离培养基中均加入制霉菌素(终浓度 50 mg/L), 萘啶酮酸(终浓度 25 mg/L), 重铬酸钾(终浓度 25 mg/L), 以抑制真菌及细菌生长。

根据分离菌株在 ISP 2 培养基上的菌落颜色、形状、大小等形态特征将菌株进行初步鉴定、归类。

将已纯化菌株接种于 20% 甘油中 -80 °C 保存。

1.5 菌株 DNA 提取、扩增及序列分析

采用 CTAB 法^[15]进行放线菌 DNA 提取。

菌株 16S rRNA 基因的 PCR 扩增采用 27F/1492R 引物进行。

50 μ L PCR 反应体系: 2 \times Taq Master Mix 25 μ L, 10 μ mol/L 引物各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 补足至 50 μ L。

PCR 扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 90 s, 循环 35 次; 72 °C, 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物使用 1% (M/V) 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

PCR 产物送往英俊测序公司(上海)进行 16S rRNA 基因测序分析。将有效序列在 NCBI 数据库中进行比对, 将同源性最高序列定为参照菌株, 使用 MEGA 5.0 软件进行序列比对, 比对采用 Kimura 2-parameter model 模型计算进化距离, 邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统进化树, 同时运用最大似然法和最大简约法构建系统树检验系统进化树的稳定性。

1.6 放线菌抗菌活性筛选

采用双层琼脂扩散法^[16], 即点接实验菌株于底层培养基上, 28 °C 培养 6 d 后, 将其上倒入一层含指

示菌的培养基, 倒置培养 12 - 24 h。分别测量抑菌圈直径(Di)和拮抗菌菌落直径(Dc), 计算 Di/Dc 比值, 当 Di/Dc \geq 2.0 时即视为有较强抑菌活性, Di/Dc < 2.0 这里不做讨论。

1.7 发酵液提取物制备及 HPLC 分析

选初筛具有较强抗菌活性的菌株, 转接于 5 种发酵培养基, 28 °C、150 r/min 培养 7 d, 离心得到粗提液。采用打孔法^[17]对粗提液进行抗菌活性复筛。

粗提液中加入等体积乙酸乙酯, 震荡, 静置分层, 收集乙酸乙酯层于旋蒸瓶中, 40 °C 真空旋转蒸发干燥, 加入 1 mL 甲醇溶解提取物。

甲醇溶解样品用 0.22 μ m 孔径滤膜过滤。20 μ L 进样于 HPLC 仪。色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 波长 254 nm, 柱温 30 °C, 流速 1.00 mL/min, 流动相为甲醇和超纯水, 并在 40 min 内使甲醇比例从 10% 到 90% 线性梯度洗脱, 之后在 90% 保持 10 min^[18]。

1.8 五类活性物质合成基因扩增

放线菌次级代谢产物合成途径中包含一些关键酶, 如聚酮合酶(PKS)、非核糖体肽合成酶(NRPS)、安莎类化合物(AHBA)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGA)等, 它们可以合成不同类型的化合物骨架, 再通过各种后期修饰酶的作用, 最终形成结构多样的活性化合物。本研究使用 5 套 PCR 引物(表 3)对 5 种功能基因进行扩增。50 μ L PCR 反应体系: 2 \times Taq Master Mix 25 μ L, 10 μ mol/L 引物各 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 3. 扩增活性物质合成基因的 PCR 引物

Table 3. PCR primers for amplifying the biosynthetic genes used in this study

Primers	Sequence(5'→3')	Target gene	PCR programs
K1F	TSAAGTCSAACATCGGBCA	PKS I ^[19]	95 °C for 4 min; 30 cycles of 94 °C for 1 min, 57 °C for 1 min and 72 °C for 1 min; and a final extension cycle at 72 °C for 10 min
M6R	CGCAGGTTSCSGTACCACTA		
KS $_{\alpha}$ F	TSGCSTGCITGGAYGCSATC	PKS II ^[20]	95 °C for 4 min; 30 cycles of 94 °C for 1 min, 58 °C for 1 min and 72 °C for 1 min; and a final extension cycle at 72 °C for 10 min
KS $_{\beta}$ R	TGGAANCCGCCAABCCTCT		
A3F	GCSTACSYSATSTACACSTCSGG	NRPS ^[19]	95 °C for 4 min; 30 cycles of 94 °C for 1 min, 57 °C for 1 min and 72 °C for 1 min; and a final extension cycle at 72 °C for 10 min
A7R	SASGTCVCCSGTSCGGTAS		
P1	AGAGGATCCTTCGAGCRSGAGTTCCG	AHBA ^[21]	95 °C for 5 min; 30 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 1 min; and a final extension cycle at 72 °C for 10 min
P2	GCAGGATCCGGAMCATSGCCATGTAG		
HMGF	GGGCATCGCCGACCTCGTCGACGACCG	HMGA ^[22]	95 °C for 5 min; 35 cycles of 95 °C for 1 min, 62 °C for 1 min and 72 °C for 1 min; and a final extension cycle at 72 °C for 10 min
HMGR	GCGATGACGGCAGCGCGGGCGTCTC		

2 结果和分析

2.1 五种培养基分离放线菌的效果

使用5种培养基从26个底泥样品中共分离得到放线菌300余株,根据在ISP2培养基上的菌落形态及颜色差异去重复,得到135株。表4显示,M2和M4培养基分离出的菌株数量最多,但在M5培养基分离的种属多样性和稀有放线菌最高。而M3培养基分离菌株单一,只有链霉菌属(*Streptomyces*),且在分离过程中易受其他微生物的污染(如细菌、真菌)。

表4. 5种培养基分离星湖湿地放线菌的效果

Table 4. Actinomycetes diversity isolated by 5 selective media from Xinghu Wetland

Medium	Genus	Total genus	Strains numbers
M1	<i>Amycolatopsis</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i>	4	8
M2	<i>Dactylosporangium</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Saccharopolyspora</i> , <i>Streptomyces</i>	6	43
M3	<i>Streptomyces</i>	1	3
M4	<i>Actinomadura</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nonomuraea</i> , <i>Streptomyces</i>	6	43
M5	<i>Knoellia</i> , <i>Micromonospora</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Streptomyces</i>	7	38

2.2 湿地放线菌多样性

本研究中的135株放线菌,属于放线菌纲的7个目10个科13个属,分别为:棒杆菌亚目(*Corynebacterineae*)中的诺卡氏菌科(*Nocardiaceae*)中的诺卡氏菌属(*Nocardia*)10株和红球菌属(*Rhodococcus*)4株;微球菌亚目(*Micrococccineae*)中的间孢囊菌科(*Intrasporangiaceae*)中的黄色诺尔氏菌属(*Knoellia*)1株,微杆菌科(*Microbacteriaceae*)中的微杆菌属(*Microbacterium*)1株,微球菌科(*Micrococccaceae*)中的微球菌属(*Micrococcus*)3株;小单孢菌亚目(*Micromonosporineae*)中的小单孢菌科(*Micromonosporaceae*)中的小单孢菌属(*Micromonospora*)29株和指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)1株;丙酸杆菌亚目(*Propionibacterineae*)中的类诺卡氏菌科(*Nocardioidaceae*)中的类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)1株;假诺卡氏亚目(*Pseudonocardineae*)中的假诺卡氏菌科(*Pseudonocardaceae*)中的糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)2株和拟无枝菌酸菌属

不同培养基中分离的菌株具有特殊性,拟无枝菌酸菌属(*Amycolatopsis*)为M1培养基所分离,微杆菌属(*Microbacterium*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)和指孢囊菌属(*Dactylosporangium*)为M2培养基所分离,马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)和野野村放线菌属(*Nonomuraea*)为M4培养基所分离,黄色诺尔氏菌属(*Knoellia*)和类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)是M5培养基所分离。因此,根据菌株数目、种属数目、以及稀有放线菌多样性,比较好的培养基依次为M2培养基、M4培养基、M5培养基、M1培养基。

(*Amycolatopsis*)1株;链霉菌亚目(*Streptomycineae*)中的链霉菌科(*Streptomycetaceae*)中的链霉菌属(*Streptomyces*)80株;链孢囊菌亚目(*Streptosporangineae*)中的高温单孢菌科(*Thermomonosporaceae*)中的马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)1株和链孢囊菌科(*Streptosporangiaceae*)中的野野村氏菌属(*Nonomuraea*)1株。图1显示代表菌株的16S rRNA基因序列系统发育树。

2.3 湿地放线菌抗菌活性

表5显示分离的放线菌的抗菌活性检测结果。实验的83株放线菌中有24株表现出至少对1种指示菌有抗菌活性,占检测菌株的28.9%。其中24.09%、4.8%的菌株分别对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有抗性,没有发现可以抑制沙门氏菌的放线菌菌株。其中,菌株XD7、XD17、XD32、XD72、XD114、XD120、XD128、XD151抑菌效果明显。16S rRNA基因分析结果显示,这些菌株以链霉菌为主,小单孢菌株为辅。

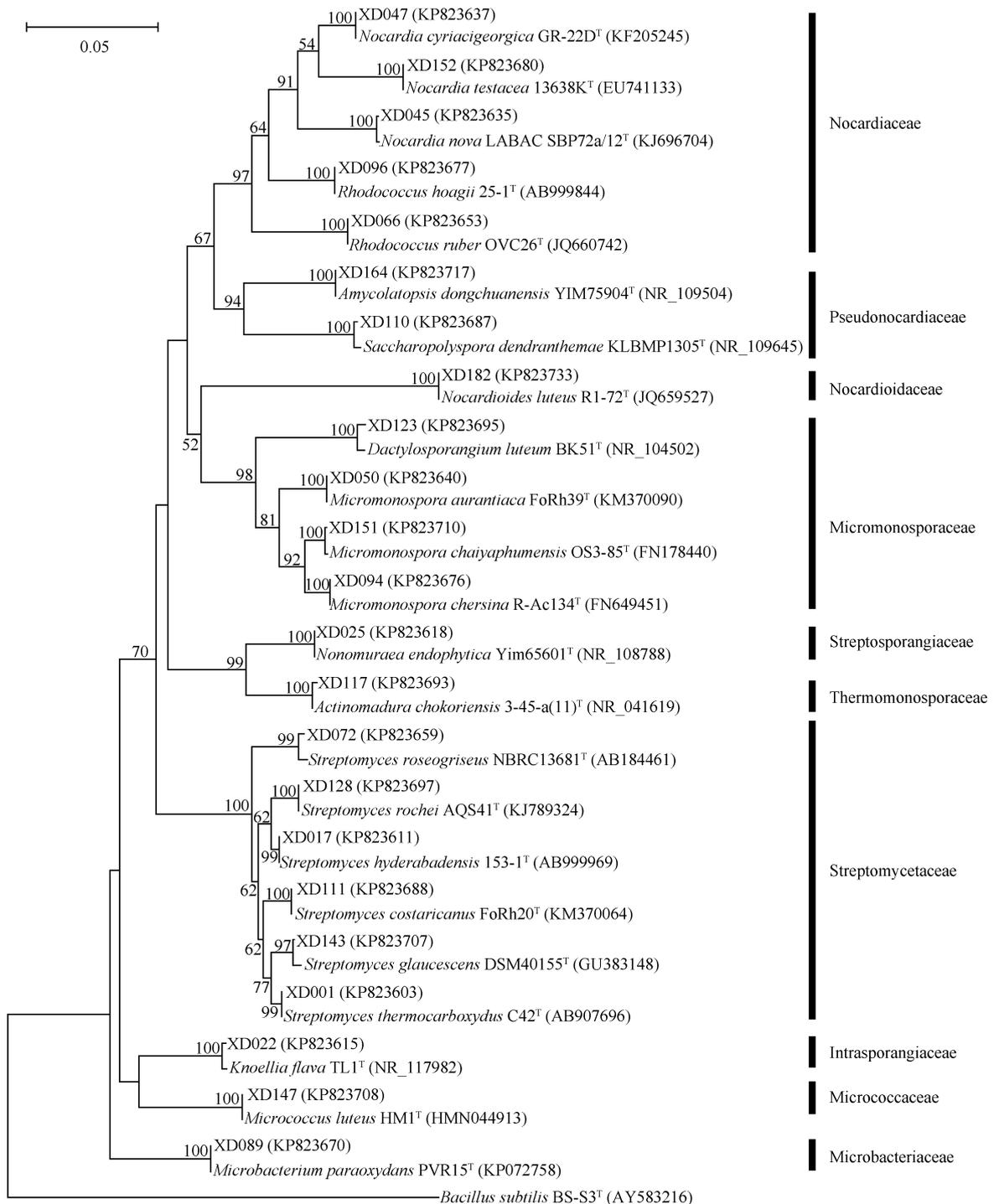


图 1. 根据 16S rRNA 基因序列构建的星湖湿地放线菌菌株系统进化树

Figure 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the diversity of actinobacteria isolated from Xinghu Wetland sediments. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The sequence of *Bacillus subtilis* BS-S3^T was used as the outgroup. Bar, 5% sequence divergence.

表 5. 星湖湿地底泥中分离获得的放线菌
代表菌株的抑菌活性

Table 5. Antimicrobial activities of representative strains of
actinobacterial strains isolated from Xinghu Wetland
sediments

Strains	Di/Dc			Genus
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coil</i>	<i>Salmonella</i>	
XD 1	-	2. 30	-	<i>Streptomyces</i>
XD 4	2. 50	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 7	3. 79	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 13	-	2. 24	-	<i>Streptomyces</i>
XD 17	-	3. 40	-	<i>Streptomyces</i>
XD26	2. 10	+	-	<i>Streptomyces</i>
XD 32	4. 74	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD39	2. 33	+	-	<i>Streptomyces</i>
XD 42	2. 10	+	-	<i>Streptomyces</i>
XD 50	-	2. 20	-	<i>Micromonospora</i>
XD 71	2. 28	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 72	5. 24	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 74	2. 72	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 76	2. 10	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 102	2. 10	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 111	2. 30	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 114	2. 83	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 117	2. 29	-	-	<i>Actinoadura</i>
XD 120	7. 51	-	-	<i>Micromonospora</i>
XD 128	2. 47	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 134	2. 74	-	+	<i>Streptomyces</i>
XD 140	3. 10	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD143	2. 22	-	-	<i>Streptomyces</i>
XD 151	3. 72	-	-	<i>Micromonospora</i>

+ ;Di/Dc < 2. 0, - ;no activity.

选取活性较好的 12 株放线菌采用 5 种培养基进行发酵液的复筛。结果显示 3 株菌株 XD7、XD114、XD128 在 F2 培养基中发酵液对 3 种指示菌均具有较强活性,具有一定开发潜力。通过 16S rRNA 基因序列分析显示(图 2),这 3 株菌都属于娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*)。

2.4 发酵产物 HPLC 分析

选取 XD7、XD114、XD128 三株菌株样品发酵进行 HPLC 检测,在 254nm 波长的条件下,结果(图 3)显示这三株菌均产生大量的次级代谢产物;且发酵产物的 HPLC 图谱显示这三株放线菌在相同时间段均能产生吸收峰(实心箭头指示)。这三株放线菌虽然属于同一个种,但其在相同培养基产生的代谢产物均有差异(空心箭头所示)。

2.5 功能基因的筛选

选取上述 24 株菌株,扩增了 PKS I, PKSII, NPRS, AHBA 和 HMG CoA 这 5 类化合物的合成基因。结果(表 6)显示,24 株检测菌中 PKS I 基因呈阳性的比率为 16.7%,PKS II 基因呈阳性的比率为 62.5%,NRPS 基因呈阳性的比率为 16.7%,AHBA 基因呈阳性的比率为 12.5%,HMGA 基因呈阳性的比率为 29.2%。菌株 XD7、XD17、XD128 和 XD143 表现出至少对 3 类功能基因呈现阳性。同时菌株 XD128 在 PKS I、PKS II、NRPS 及 HMGA 均呈现出阳性,且此菌株在活性筛选中对 3 种指示菌均有明显抑制作用,因此关于此菌株的次级代谢产物仍需进一步的研究,有可能发现更多结构新颖的活性物质。

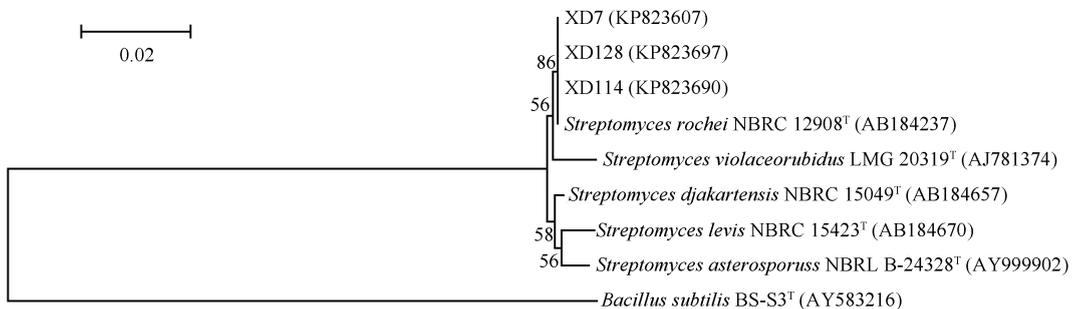


图 2. 根据 16S rRNA 基因序列构建的 3 株放线菌菌株系统进化树

Figure 2. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the three strains. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap.

The sequence of *Bacillus subtilis* BS-S3^T was used as the outgroup. Bar, 2% sequence divergence.

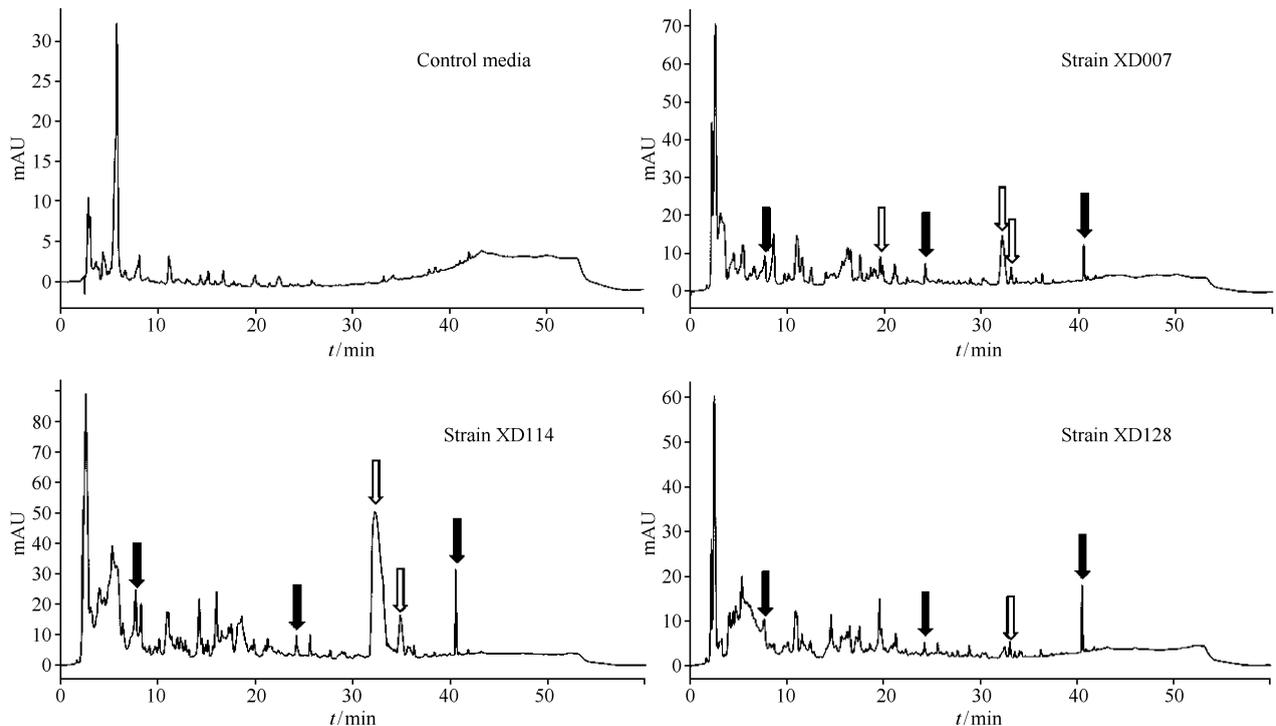


图 3. 三株放线菌次级代谢产物在 254 nm 处 HPLC 图谱

Figure 3. HPLC chromatography of secondary metabolites at 254 nm.

表 6. 从星湖湿地底泥中来源的放线菌代表菌株扩增合成聚酮合酶、非核糖体多肽合成酶、安莎类化合物及 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶的功能基因筛选

Table 6. PCR amplification of the genes encoding PKS I, PKS II, NRPS, AHBA and HMG CoA syntheses from the representative actinomycetes strains isolated from

Xinghu Wetland sediments

Strains	PKS I	PKS II	NRPS	AHBA	HMG CoA
XD 1	-	+	-	-	+
XD 4	-	-	-	+	-
XD 7	+	+	+	-	-
XD 13	-	+	-	-	+
XD 17	-	+	+	-	+
XD 26	-	+	-	-	-
XD 32	-	+	-	-	-
XD39	-	+	-	-	-
XD 42	-	-	-	-	-
XD 50	-	+	-	-	+
XD 71	-	-	-	-	-
XD 72	+	+	-	-	-
XD 74	-	-	-	-	-
XD 76	-	+	-	+	-
XD 102	-	-	-	-	-
XD 111	+	+	-	-	-
XD 114	-	+	+	-	-
XD 117	-	-	-	-	-
XD 120	-	-	-	-	-
XD 128	+	+	+	-	+
XD 134	-	-	-	-	-
XD 140	-	+	-	-	-
XD143	-	+	-	+	-
XD 151	-	-	-	-	+

3 讨论

本研究以纯培养方法和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对星湖湿地可培养放线菌群落结构进行研究。通过使用不同培养基共获得 135 株放线菌,分属于放线菌纲 7 个目 10 个科 13 个属。该结果表明,星湖湿地具有丰富的湿地放线菌资源,其优势类群为链霉菌属、小单孢菌属及诺卡氏菌属,与之前 Chenglin Jiang 等^[23]报道的云南湖泊放线菌多样性相一致。但 Maya George 等^[24]对印度喀拉拉邦湿地分离结果发现类诺卡氏菌形放线菌(*Nocardioform actinomycetes*)作为重要的放线菌存在于湿地中,而且星湖湿地中分离的黄色诺尔氏菌属(*Knoellia*)拟无枝菌酸菌属(*Amycolatopsis*)等在印度喀拉拉邦湿地中未见分离,从而表明了星湖湿地放线菌具有其独有的特性,同时也表明了在不同的湿地环境中放线菌的多样性有很大差异。其中分离菌株以链霉菌(58.8%)为主,也存在大量稀有放线菌(41.2%)类群,与笔者前期运用 PCR-DGGE 技术对该地区放线菌群落特征研究相一致。但本研究中还可能存在尚未分离得到的种属,如大理石雕菌属(*Marmoricola*)、白蚁菌属(*Isoptericola*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、浮游放线菌属(*Actinoplanes*)等。可能是由于笔者使用的分离方法还比较单一,在后期

的实验中应当尝试使用多种分离方法并且尽量模拟原始生境。分离培养基 M2 对放线菌分离的效果最好,不仅分离的菌株数多且稀有放线菌种类多,究其原因可能是 M2 培养基中含有放线菌所偏好的甘油^[25],其次微量盐提供了必须的无机营养成分,故 M2 培养基的分离效果不错。

本研究采用双层琼脂扩散法测定了对 3 种人类病原菌的抑菌活性,获得 24 株高活性菌株。其中 20 株对 *Staphylococcus aureus* 有较好活性,4 株对 *Escherichia coli* 有较好活性,但对 *Salmonella* 没有较强效果。与 Gebreselema 等^[26]对塔娜湖湖底沉积物放线菌抗菌活性研究结果相一致,即放线菌对革兰氏阳性菌的抑制明显大于革兰氏阴性菌。结合功能基因筛选,这 3 株菌株表现出至少含有 2 种功能基因。这些表明星湖湿地放线菌具备产生多种生理活性物质的巨大潜力,为寻找新的抗菌药物提供重要的资源。

菌株 XD007、XD114、XD128 经过 16S rRNA 基因序列比对鉴定为娄彻氏链霉菌 (*Streptomyces rochei*)。娄彻氏链霉菌是链霉菌属的一个重要类群,该类群菌株能够产生种类繁多的活性化合物,例如, Selvakumar 等^[27]从印度康亚库玛瑞海底沉积物中分离的娄彻氏链霉菌对常见的人类病原体绿脓杆菌,大肠杆菌,克雷伯氏肺炎菌,粪肠球菌和金黄色葡萄球菌均具有抗性;马林等^[28]从辣椒根部分离得到娄彻氏链霉菌的次级代谢产物中的 2,6-二叔丁基对甲酚和 3,5-二叔丁基-4-羟基-苯甲醚对番茄灰霉病菌具有抑制作用;李周等^[29]从娄彻氏链霉菌 ATCC10739 的发酵液中分离纯化得到的化合物 Borrelidin 具有抗病毒和抗菌活性。此外,近年来的研究表明,娄彻氏链霉菌不仅能够产生多种具有抗菌活性的次级代谢产物,而娄彻氏链霉菌本身还具有较高的抗农业病原菌、杀虫及除草活性,并在植物病毒和植物病原真菌的生物防治中都有着广泛的应用^[30]。本研究采用 HPLC 对 3 株具有强抑菌活性的娄彻氏链霉菌 (*Streptomyces rochei*) 抑菌活性物质进行了初步分析。初步表明该菌株能产生大量次级代谢产物,而代谢产物类型及结构还需进一步的研究。

本研究表明,在星湖湿地蕴藏着大量放线菌资源,但由于分离技术等限制,大量的放线菌还未能通过现有的选择性分离方法获得纯培养物,所以提出新思路,设计新的选择性分离方法,分离目前还未能培养的湿地放线菌。对于已经分离到的湿地放线菌,一方面要优化培养条件刺激微生物产生多种生物活性的次级代谢产物,另一方面可以直接从基因

入手,通过基因筛选来针对性地获得结构和活性新颖的次级代谢产物。本文对分离得到的湿地放线菌生物活性实验的研究,也说明星湖湿地底泥放线菌具有产生丰富活性代谢产物的潜力。随着培养技术的发展、完善以及后续的生物活性筛选和代谢产物的深入研究,湿地特殊生境放线菌将会得到更完善的挖掘及应用。

致谢:感谢肇庆星湖风景名胜区管理处为我们采集样品提供的无私帮助与支持。

参考文献

- [1] Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics; where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, 2012, 65(8): 385-395.
- [2] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites: a personal review. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1-26.
- [3] Zheng CY, Wang GH. Research progress on main functional microorganisms in wetland ecosystems. *Wetland Science*, 2012, 10(2): 243-249. (in Chinese)
郑春雨, 王光华. 湿地生态系统中主要功能微生物研究进展. *湿地科学*, 2012, 10(2): 243-249.
- [4] Peralta RM, Ahn C, Gillevet PM. Characterization of soil bacterial community structure and physicochemical properties in created and natural wetlands. *The Science of the Total Environment*, 2013, 443: 725-732.
- [5] Zhao XL, Zhou GS, Zhou L. The characteristics of soil microbe in Panjin reed wetland. *Journal of Meteorology and Environment*, 2006, 22(4): 64-67. (in Chinese)
赵先丽, 周广胜, 周莉. 盘锦芦苇湿地土壤微生物特征分析. *气象与环境学报*, 2006, 22(4): 64-67.
- [6] Du G, Huang L, Gao X, Lu YY, Liu M, Guo JS. Number of microbe and relationship between it and removal of pollutants in constructed wetlands. *Wetland Science*, 2013, 11(1): 13-20. (in Chinese)
杜刚, 黄磊, 高旭, 鲁言言, 刘明, 郭劲松. 人工湿地中微生物数量与污染物去除的关系. *湿地科学*, 2013, 11(1): 13-20.
- [7] Jiang CL, Xu LH. Studies on actinomycete flora and resources in the plateau lakes in Yunnan. *Acta Microbiologica Sinica*, 1989, 29(1): 7-14. (in Chinese)
姜成林, 徐丽华. 云南高原湖泊放线菌区系及资源的研究. *微生物学报*, 1989, 29(1): 7-14.
- [8] Buesing N, Filippini M, Bürgmann H, Gessner MO. Microbial communities in contrasting freshwater marsh microhabitats. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 69(1): 84-97.
- [9] He JQ, Zhang GJ, Yue HM. Diversity and bioactivity analysis of actinomycetes isolated from Lhalu wetland nature reserve. *Journal of Microbiology*, 2009, 29(4):

- 6-10. (in Chinese)
何建清, 张格杰, 岳海梅. 拉鲁湿地自然保护区放线菌组成分析及生物活性测定. 微生物学杂志, 2009, 29(4): 6-10.
- [10] He J, Zhang DF, Xu Y, Zhang XM, Tang SK, Xu LH, Li WJ. Diversity and bioactivities of culturable marine actinobacteria isolated from mangrove sediment in Indian Ocean. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(10): 1195-1202. (in Chinese)
何洁, 张道锋, 徐盈, 张晓梅, 唐蜀昆, 徐丽华, 李文均. 印度洋红树林沉积物可培养海洋放线菌多样性及其活性. 微生物学报, 2012, 52(10): 1195-1202.
- [11] Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao HG, Zhuang L, Lin HP, Yu HP, Li J, Yao XS, Goodfellow M, Ruan JS. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 2009, 7(1): 24-44.
- [12] Tang YL, Wang R, Hong K. Isolation and environmental adaptation of endophytic actinomycetes in *Acanthus ilicifolius* of different mangrove. *Microbiology China*, 2012, 39(1): 25-32. (in Chinese)
唐依莉, 王蓉, 洪葵. 不同红树林地区老鼠簕内生放线菌的分离及其环境适应性. 微生物学通报, 2012, 39(1): 25-32.
- [13] Xue D, Zhao GZ, Zhao HQ, Yao Q, Zhu HH. Actinobacterial diversity in Xinghu wetland. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(5): 616-626.
薛冬, 赵国振, 赵海泉, 姚青, 朱红惠. 肇庆星湖湿地放线菌多样性. 微生物学报, 2015, 55(5): 616-626.
- [14] Hayakawa M, Sadakata T, Kajiura T, Nonomura H. New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1991, 72(5): 320-326.
- [15] Murray MG, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [16] Luo WX, Chen XJ, Huang YJ, Zheng ZH, Su WJ. Relationship between antimicrobial activity of marine *Streptomyces* spp. and their culture conditions. *Microbiology China*, 1998, 25(6): 325-328. (in Chinese)
罗文新, 陈晓佳, 黄耀坚, 郑忠辉, 苏文金. 来自海洋的链霉菌抑菌活性与其培养条件的关系. 微生物学通报, 1998, 25(6): 325-328.
- [17] Fyhrquist P, Mwasumbi L, Hæggeström CA, Vuorela H, Hiltunen R, Vuorela P. Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, 79(2): 169-177.
- [18] Chen Y, Cao YR, Cai XF, Zhao LX, Duan RL, Xu LH. A study on fermentation media of plant endophytes. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2008, 33(9): 524-527. (in Chinese)
陈云, 曹艳茹, 蔡祥凤, 赵立兴, 段若玲, 徐丽华. 植物内生菌发酵培养基的初探. 中国抗生素杂志, 2008, 33(9): 524-527.
- [19] 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. *Microbial Ecology*, 2005; 49(1): 10-24.
- [20] Metsä-Ketelä M, Salo V, Halo L, Hautala A, Hakala J, Mäntsälä P, Ylihönko K. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 180(1): 1-6.
- [21] Huitu Z, Linzhan W, Aiming L, Guizhi S, Feng H, Qiuping L, Yuzhen W, Huanzhang X, Qunjie G, Yiguang W. PCR screening of 3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthase gene leads to identification of ansamycins and AHBA-related antibiotic producers in actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(3): 755-763.
- [22] Sigmund JM, Clark DC, Rainey FA, Anderson AS. Detection of eubacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductases from natural populations of actinomycetes. *Microbial Ecology*, 2003, 46(1): 106-112.
- [23] Jiang CL, Xu LH. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(1): 249-253.
- [24] George M, George G, Hatha AAM. Diversity and antibacterial activity of actinomycetes from wetland soil. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 2010, 28(1): 52-57.
- [25] Takahashi Y, Omura S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2003, 49(3): 141-154.
- [26] Gebreyohannes G, Moges F, Sahile S, Raja N. Isolation and characterization of potential antibiotic producing actinomycetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2013, 3(6): 426-435.
- [27] Selvakumar P, Viveka S, Prakash S, Jasminebeeayla S, Uloganathan R. Antimicrobial activity of extracellularly synthesized silver nanoparticles from marine derived *Streptomyces rochei*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2012, 3(3): 188-197.
- [28] Ma L, Chen HB, Han JC. Identification of endophytic actinomycete Lj20 from plant and its antifungal substances. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(7): 900-904. (in Chinese)

马林, 陈红兵, 韩巨才. 植物内生放线菌 Lj20 的鉴定及其抗真菌物质的合成. 微生物学报, 2008, 48(7): 900-904.

- [29] Li Z, Zhao SY. Borrelidin production by *Streptomyces rochei* ATCC10739: optimization of fermentation, separation and purification conditions. *Microbiology China*, 2011, 38(7): 1051-1055. (in Chinese)
李周, 赵圣印. 娄彻氏链霉菌 ATCC10739 产抗生素

Borrelidin 发酵条件优化及其分离纯化. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1051-1055.

- [30] Chen LL, Gao BD. Progress of the research on microbial metabolites against plant virus disease. *Chinese Journal of Biological Control*, 2006, 22(4): 255-260. (in Chinese)
陈力力, 高必达. 微生物抗植物病毒活性物的研究进展. 中国生物防治, 2006, 22(4): 255-260.

Diversity of cultivable actinobacteria in Xinghu wetland sediments

Dong Xue^{1,2}, Guozhen Zhao², Qing Yao³, Haiquan Zhao^{1*}, Honghui Zhu^{2*}

¹College of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 210095, Anhui Province, China

²Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry Province Joint Development), Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

³College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong Province, China

Abstract: [**Objective**] To study the diversity of cultivable actinobacteria in Xinghu wetland and screen actinobacteria with a pharmaceutical potential for producing biologically active secondary metabolites. [**Methods**] We studied the diversity of actinobacteria isolated from Xinghu wetland by using different selective isolation media and methods. The high bioactive actinobacteria were identified and further investigated for the presence of polyketide synthases (PKS-I, PKS-II), nonribosomal peptide synthetases (NRPS), 3-amino-5-hydroxybenzoic acid synthases (AHBA) and 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A (HMG CoA) sequences by specific amplification. [**Results**] More than 300 actinobacteria were isolated, and 135 isolates were selected on the basis of their morphologies on different media and were further characterized by 16S rRNA gene sequencing. The isolates belonged to 7 orders, 10 families, 13 genera, *Streptomyces* was the most frequently isolated genus, followed by the genera *Micromonospora* and *Nocardia*. Twenty-four isolates showed high activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, but there no strain displaying antagonistic activity against *Salmonella* sp. High frequencies of positive PCR amplification were obtained for PKS-I (16.7%, 4/24), PKS-II (62.5%, 15/24), NRPS (16.7%, 4/24), HMG CoA (29.2%, 7/24) and AHBA (12.5%, 3/24) biosynthetic systems. High Performance Liquid Chromatography showed that strain XD7, XD114, XD128 produce lots of secondary metabolites. [**Conclusion**] This study indicated that actinobacteria isolated from Xinghu wetland are abundant and have potentially beneficial and diverse bioactivities which should be pursued for their biotechnical promise.

Keywords: actinobacteria, diversity, functional gene, bioactivity-screening

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31300011), by the Guangdong Provincial Research Foundation for Basic Research (2013B060400043), by the Special Foundation for Young Scientists of Guangdong Academy of Sciences (rcjj201301) and by the Foundation for Young Scientists of Guangdong Institute of Microbiology

* Corresponding author. Tel: +86-551-65786059; E-mail: swjs12@ahau.edu.cn

Received: 9 February 2015/Revised: 8 May 2015