



贵州兴义喀斯特洞穴可培养放线菌多样性及抗菌活性初筛

张万芹¹, 房保柱², 韩明贤³, 李帅², 董雷², 蒋宏忱³, 李文均^{2*}

¹兴义民族师范学院, 生物与化学学院, 贵州 兴义 562400

²中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

³中国地质大学(武汉)生物地质与环境地质国家重点实验室, 湖北 武汉 430074

摘要: 【目的】进一步了解兴义喀斯特洞穴可培养放线菌资源及产活性代谢产物的能力。【方法】选取多种分离培养基, 利用稀释直接涂布平板法对贵州黔西南兴义市多个喀斯特洞穴的土壤和岩石进行可培养放线菌资源分离; 利用三种发酵培养基对相关放线菌进行生物产物初筛。【结果】根据16S rRNA基因序列的比对分析, 将分离得到的251株放线菌分别归类到44个属, 其中链霉菌属(*Streptomyces*)占分离菌株的比例为24.30%, 小单孢菌属(*Micromonospora*)占比11.95%, 红球菌属(*Rhodococcus*)占比9.16%, 微杆菌属(*Microbacterium*)占比7.17%, 诺卡氏菌属(*Nocardia*)占比6.37%, 该五类放线菌为该地区可培养放线菌的优势菌群。对70株细菌进行活性次级代谢产物筛选, 其中35株放线菌对指示菌具有抑制活性, 且主要类群为链霉菌属和小单孢菌属。【结论】贵州兴义喀斯特洞穴中存在丰富多样的放线菌类群, 且蕴藏大量具有产生活性次级代谢产物能力的菌株, 为医药产业提供潜力菌株资源, 极具进一步发掘和研究的价值。

关键词: 喀斯特洞穴, 放线菌, 多样性, 次级代谢产物

喀斯特(Karst)是具有溶蚀力的水对可溶性岩石进行化学溶蚀、流水侵蚀、冲蚀和塌陷等过程综合作用形成的特殊地貌^[1]。中国喀斯特地貌分布广袤, 发育强烈, 其中以云贵高原尤为突出, 是世界上最大的喀斯特地貌区域之一^[1]。喀斯特洞穴作为喀斯特地貌特有组成部分之一, 具有以

下特征: 生境的不连续性、无光照、空气几乎恒定无流动、湿度接近饱和、营养物质贫乏等, 因此, 喀斯特洞穴被认为是一种极端的陆地生态系统^[2]。中国著名的喀斯特地貌区域分布于广西、云南、贵州和四川等省(区), 同时也是喀斯特资源最丰富的国家之一^[3-4], 在贵州黔西南地区, 分

基金项目: 国家自然科学基金(31600103, 31600015, 31670009)

*通信作者。Tel/Fax: +86-20-84111727; E-mail: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2020-01-08; 修回日期: 2020-02-27; 网络出版日期: 2020-04-20

布了大量喀斯特洞穴资源,使该地区成为贵州省重要的土壤贫瘠区域。喀斯特洞穴作为喀斯特地貌重要组成部分,因其内部一系列环境特点(黑暗,营养物质低等)而形成一个相对稳定的极端环境^[5]。而大量研究结果表明,喀斯特洞穴中的微生物资源种类多样,尤其对放线菌资源多样性有了新的认识。

国内外研究表明,喀斯特洞穴中存在着丰富的放线菌资源。1999年,Groth等针对蒂托巴斯蒂罗洞穴的可培养放线菌类群进行探索研究,发现除链霉菌属(*Streptomyces*)和诺卡氏菌属(*Nocardia*)外,其优势菌群还包括短杆菌属(*Brevibacterium*)、拟无枝菌酸菌属(*Amycolatopsis*)和糖丝菌属(*Saccharothrix*)等稀有类群^[6]。2006年,Ikner等在研究了美国亚利桑那州的Kartchner国家地质公园中旅游洞穴中的可培养微生物多样性,分离过程中发现了链霉菌属(*Streptomyces*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)和库克氏菌属(*Kocuria*)等多种放线菌^[7]。随后,Ortiz等利用扩增子测序方法对Kartchner洞穴的放线菌资源进行调查,发现链霉菌属(*Streptomyces*)和诺卡氏菌属(*Nocardia*)为该洞穴主要放线菌类群^[8]。Quintana等在研究墨西哥纳艾卡水晶洞穴中的微生物多样性过程中,发现放线菌普氏菌属(*Prauserella*)在水晶表面和洞穴岩壁有分布,并且这些放线菌在系统进化上表现出样品差异性^[9]。此外,随着近年来天然活性产物研究的底盘微生物种类越发单一,研究者们对喀斯特环境等特殊生境放线菌资源的研究不断深入,大量的天然活性产物被发现,如Cervimycin A-D、undecylprodigiosin、

cyclodysidin D、chaxalactin B、stylissazole B和gyrophoric acid等^[10-12]。因此,喀斯特环境中放线菌资源值得进一步深入探索。

当前,喀斯特洞穴放线菌群落组成的报道在国内不多,尽管对喀斯特微生物代谢产物的研究已有报道,但仍相对较少,因此,该方向的研究前景广阔。本研究旨在了解贵州兴义地区喀斯特洞穴中可培养放线菌的多样性及这些放线菌次生代谢产物的活性,为促进洞穴和喀斯特生态学与地质微生物学研究奠定一定的基础,同时为开发具有应用潜力的放线菌资源提供物质基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料:通过三角采样法,于2015年8月取自贵州省黔西南州布依族少数民族自治州兴义市采集土壤和岩石样品,于4 °C冰箱保存备用,具体样点及部分采样点信息如表1与图1所示。

1.1.2 主要仪器:PCR仪(BIO-RAD)、凝胶成像仪(GEL Logic200 Imaging System)、电泳仪(BIO-RAD)。试剂:PCR引物(捷瑞,上海)、DNA聚合酶、制霉菌素等。

1.1.3 分离培养基(g/L):每种分离培养基加制霉菌素50 mg/L。

(1) CC培养基; (2) HP培养基; (3) 察氏培养基; (4) ISP 5培养基; (5) R2A培养基; (6) SC培养基; (7) T5培养基; (8) Cl-Na-HCO₃培养基; (9) AV培养基等的配制参照文献[13]。(10) 38#培养基(g/L)^[14]: 酵母膏4.0 g, 葡萄糖4.0 g, 麦芽浸膏5.0 g, B族复合维生素1.0 mL, 蒸馏水1 L, 琼脂15 g, pH 7.5。

表 1. 贵州省兴义市洞穴样点的样品信息
Table 1. Sampling information of karst caves from Xingyi, Guizhou

Samples	Coordinates	Sample sites	Characteristics	T/°C
XX5	E104°46'/N25°09'	Xiaotu Po (肖土坡)	Dry soil	20
XX8		Xiaotu Po (肖土坡)	Dry rock	
XL2	E104°58'/N24°54'	Leng Dong (冷洞)	Rock	19
XL5		Leng Dong (冷洞)	Soil	
XL7		Leng Dong (冷洞)	Moist soil	
XS5	E104°47'/N25°9'	Shazhu Po (杀猪坡)	Moist soil	20
XS7		Shazhu Po (杀猪坡)	Mixture (soil and rock)	
XG4	E104°47'/N25°9'	Guizi Dong (贵子洞)	Mixture (soil and rock)	21
XG10		Guizi Dong (贵子洞)	Rock	

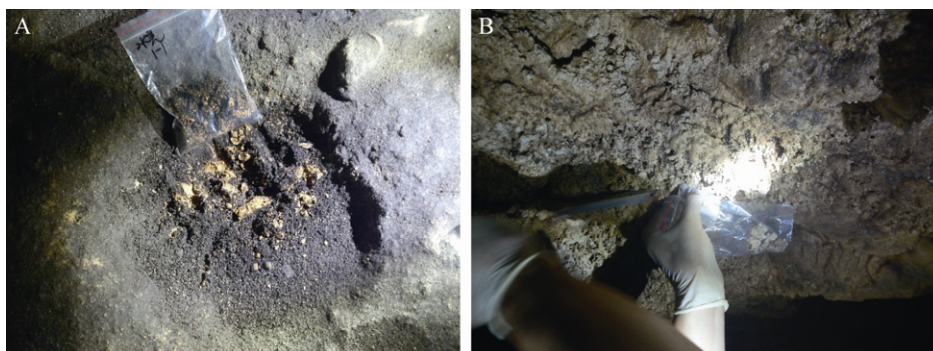


图 1. 样品采集现场的部分土壤、岩石形态
Figure 1. The soil and rock sample from collection place.

(11) HV 培养基(g/L)^[15]: 腐殖酸 1.0 g (研碎加 10 mL 0.2 mol/L NaOH 再研; 过夜, 加 500 mL 水煮沸, 离心, 将 pH 值调至 7.5), KCl 1.7 g, Na₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, CaCl₂ 1.0 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, B 族复合维生素 1.0 mL, 琼脂 15 g, pH 7.5。

B 族复合维生素: V_{B1}、V_{B2}、V_{B3}、V_{B5}、V_{B6}、肌醇、对氨基苯甲酸各 0.5 mg/L, 生物素 0.25 mg/L。

1.1.4 发酵培养基: RA(g/L): 可溶性淀粉 20 g (煮沸溶解), 葡萄糖 10 g, 麦芽糖 10 g, 麦芽提取粉 10 g, 玉米粉 5 g, CaCO₃ 2 g, pH 7.5。

ISP 2(g/L): 葡萄糖 4 g, 麦芽提取粉 10 g, 酵

母提取粉 4 g, pH 7.5。

AM3 (g/L): 可溶性淀粉 10 g (煮沸溶解), 大豆粉 5 g, 蛋白胨 15 g, 甘油 10 g, CaCO₃ 2 g, pH 7.5。

1.1.5 抗菌活性指示菌株: 主要的抗菌指示菌有肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、粪链球菌(*Enterococcus faecalis*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)、多耐药铜绿假单胞菌(Multiple-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*)和藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*), 上述指示菌株由中国科学院

南海海洋研究所提供。

1.2 样品预处理

不同类型喀斯特洞穴样品预处理方法参照文献[16]。称取经过处理的不同类型 5 g 样品, 加入 50 mL 无菌水制成 10^{-1} 稀释度, 180 r/min, 2 h, 进行梯度稀释。选取适当释度进行涂布平板, 28 °C 培养 14 d。

1.3 放线菌的分子生物学鉴定

1.3.1 核酸提取: 酶小量法^[17]提取放线菌的 DNA。

1.3.2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增: 通过细菌 16S rRNA 通用引物(27f/1492r^[18])对 16S rRNA 基因进行扩增, 50 μ L 反应体系与 PCR 扩增反应条件参照文献[10], PCR 产物的测序在上海生工进行。

1.3.3 基因序的比对分析: 登录 EzBioCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>)网站, 将上海生工测序返回的 16S rRNA 基因序列进行比对分析其相似性^[19]。

1.4 备选菌株活性粗提物制备

将备选菌株活化, 28 °C 培养, 并制备种子液。选用规格一致的 250 mL 三角瓶, 装入 50 mL 发酵培养基, 将种子液接种到灭菌后的 3 种发酵培养基中, 28 °C、200 r/min 摇床振荡培养 7 d。发酵上清与等体积丁酮混合超声萃取^[20], 收集丁酮萃取层, 旋转蒸发仪 45 °C 减压浓缩, 将粗提物用 1 mL 甲醇溶解, 4 °C 保存, 备用。

1.5 抗菌活性初筛

配置 LB 固体培养基于 250 mL 三角瓶中, 灭菌。待培养基放冷至 45–50 °C, 接入 50 μ L 测试细菌, 摇匀, 倒入平板。利用纸片法对相应的活性粗提物进行活性初筛, 将 30 μ L 发酵粗提物滴加于滤纸上, 37 °C 培养过夜, 观察结果。

2 结果和分析

2.1 兴义喀斯特洞穴可培养放线菌多样性

8 份兴义地区喀斯特洞穴的环境样品共分离得到 318 株放线菌, 对去重复后的 251 株进行 16S rRNA 的基因序列测定并进行比对, 共分离获得 161 株不同放线菌。它们隶属于放线菌门 (*Actinobacteria*) 的放线菌纲 (*Actinobacteria*) 的 11 个目 22 个科 44 个属, 分别是: 马杜拉菌属 (*Actinomadura*)、壤球菌属 (*Agrococcus*)、壤霉菌属 (*Agromyces*)、拟无枝菌属 (*Amycolatopsis*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、芽球菌属 (*Blastococcus*)、*Brevibacterium*、短链孢菌属 (*Catellatospora*)、短小杆菌属 (*Curtobacterium*)、糖霉菌属 (*Glycomyces*)、潮湿芽孢杆菌属 (*Humibacillus*)、间孢囊菌属 (*Intrasporangium*)、居白蚁菌属 (*Isoptericola*)、姜氏菌属 (*Jiangella*)、动球菌属 (*Kineococcus*)、北里孢菌属 (*Kitasatospora*)、考克氏菌属 (*Kocuria*)、韩国生工菌属 (*Kribbella*)、伦茨氏菌属 (*Lentzea*)、大理石雕菌属 (*Marmoricola*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、小月菌属 (*Microlunatus*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、分支杆菌 (*Mycobacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardia*)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*)、拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*)、野野村菌属 (*Nonomuraea*)、厄氏菌属 (*Oerskovia*)、假棒形杆菌属 (*Pseudoclavibacter*)、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、*Phytomonospora*、红球菌属 (*Rhodococcus*)、糖多孢菌属 (*Saccharopolyspora*)、斯塔堪布瑞德氏菌属 (*Stackebrandtia*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、腾格尔菌属 (*Tenggerimyces*)、地杆菌属 (*Terrabacter*)、威廉姆斯菌属 (*Williamsia*)、疣孢菌属 (*Verrucosisspora*) (如图 2 与表 2 所示)。



图 2. 喀斯特洞穴可培养放线菌类群系统发育树

Figure 2. The phylogenetic tree of culturable actinobacteria in the karst cave. Neighbour-joining phylogenetic tree showing the phylogenetic relationship of isolated strains based on 16S rRNA gene sequences. Bootstrap values expressed as percentages of 1000 replications. *Chloroflexus aurantiacus* (CP000909) was used as outgroup.

表 2. 各属别放线菌种类及菌株数所占比例

Table 2. The distribution of different genus and strains

Genus name	Species	Strains	Ratio of all strains
<i>Actinomadura</i>	1	1	0.39
<i>Agrococcus</i>	2	3	1.19
<i>Agromyces</i>	7	12	4.78
<i>Arthrobacter</i>	4	8	3.18
<i>Blastococcus</i>	2	3	1.19
<i>Brevundimonas</i>	1	1	0.39
<i>Catellatospora</i>	3	4	1.59
<i>Curtobacterium</i>	1	1	0.39
<i>Humibacillus</i>	1	1	0.39
<i>Glycomyces</i>	2	4	1.59
<i>Intrasporangium</i>	1	1	0.39
<i>Isoptericola</i>	3	5	1.99
<i>Jiangella</i>	2	3	1.19
<i>Kineococcus</i>	1	1	0.39
<i>Kitasatospora</i>	1	1	0.39
<i>Kocuria</i>	1	1	0.39
<i>Kribbella</i>	5	8	3.18
<i>Lentzea</i>	1	1	0.39
<i>Marmoricola</i>	1	1	0.39
<i>Micromonospora</i>	17	30	11.95
<i>Micrococcus</i>	3	5	1.99
<i>Microbacterium</i>	10	18	7.17
<i>Microlunatus</i>	1	1	0.39
<i>Mycobacterium</i>	2	4	1.59
<i>Micrococcus</i>	1	1	0.39
<i>Nocardia</i>	9	16	6.37
<i>Nocardioides</i>	3	7	2.78
<i>Nocardiosis</i>	2	4	1.59
<i>Nonomuraea</i>	3	5	1.99
<i>Oerskovia</i>	1	1	0.39
<i>Pseudoclavibacter</i>	1	1	0.39
<i>Pseudonocardia</i>	1	1	0.39
<i>Promicromonospora</i>	4	6	2.39
<i>Phytomonospora</i>	1	1	0.39
<i>Rhodococcus</i>	14	23	9.16
<i>Saccharopolyspora</i>	1	1	0.39
<i>Stackebrandtia</i>	1	1	0.39
<i>Streptomyces</i>	42	61	24.30
<i>Tenggerimyces</i>	1	1	0.39
<i>Terrabacter</i>	1	1	0.39
<i>Williamsia</i>	1	1	0.39
<i>Verrucosipora</i>	1	1	0.39

2.2 分离培养基对喀斯特洞穴放线菌资源分离比较

利用不同类型的 11 种分离培养基,对贵州喀斯特 4 个洞穴可培养放线菌资源进行分离筛选,其分离效果见图 3,多种分离培养基对洞穴放线菌的分离效果表现出明显的差异,从分离培养基而言,R2A、SC 和 HP 培养基分离效果较好,并拥有较好的放线菌类群多样性。各分离培养基分离的优势类群的差异较小,主要分离类群为链霉菌属(*Streptomyces*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)和类诺卡氏菌(*Nocardioides*)。

2.3 可培养放线菌资源抗菌活性的初筛

用 8 种革兰氏阴性指示菌,对分离获得的 70 株放线菌进行抗菌活性筛选,抑菌实验表明有 35 株具有抑菌活性,其中,有 9 株放线菌对 5 种指示菌都有抑菌活性,另外,AM3 培养基发酵效果较好。在这些具有抗菌活性的放线菌菌株中,其抗菌活性较强的菌株大多数都属于链霉菌属和小单孢菌属,而链霉菌属和小单孢菌属又是该分离培养的优势菌群,推测这些菌株具有产生最原始的抗菌活性次级代谢产物的能力。因此,可以从喀斯特洞穴中分离链霉菌和小单孢菌,发酵提取其次生代谢产物,筛选具有新的、最原始的生物活性物质。

3 讨论

本研究基于已有的洞穴微生物资源研究基础,针对喀斯特洞穴这一种特殊的极端环境中可培养放线菌资源多样性进行研究,选用不同分离培养基对洞穴放线菌进行纯培养分离,同时,将

分离样品在分离前进行合理的预处理, 从一定意义上提高了放线菌分离的出菌率, 但由于喀斯特洞穴环境的特殊性, 对放线菌资源进行纯培养分离的影响因素待继续探索和调查。

喀斯特洞穴作为极端黑暗的陆地生态系统, 与人类的关联在史前时期就有所记载, 洞穴和医药的关系也很密切。人们利用洞穴中的矿物质和特有的气候治病的史实在中外洞穴研究史中已有报道^[21-22]。在喀斯特洞穴环境中, 有机碳营养物质含量极低, 洞穴中的微生物必须具备特殊的代谢机制适应这样的极端环境。Wright 等通过对新墨西哥州的龙舌兰洞穴系统中的细菌进行调查, 发现一株类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp. LC231)具有很强的抗药性, 对 18 种不同抗生素具有抗药性能, 包括达托霉素, 达托霉素是被称作“最后手段”的抗生素。新墨西哥州的龙舌兰洞穴系统与世隔绝, 这株“神奇”超级耐药菌是如何产的? 有

研究者认为是该菌株与环境多种抗生素反复接触, 进而进化出如此强大的抗药能力^[23-25]。那么, 这类与世隔绝的喀斯特洞穴环境中如此之多的抗生素是如何产生的呢? 已有相关研究证实, 大量的产生活性天然产物的放线菌资源从喀斯特洞穴环境中分离获得, 其中, 中国学者获得一株能够产生吡喃萘醌类活性天然产物的链霉菌 *Streptomyces* sp. CC8-201, 该菌是从重庆市附近的洞穴中分离获得, *Streptomyces* sp. CC8-201 产生的 Xiakemycin A 具有抗细菌、真菌活性, 另外还具有一定的细胞毒性, 对多种肿瘤细胞具有杀灭作用^[26]。因此, 喀斯特洞穴中众多的放线菌资源为后期应用提供了可能^[27]。

喀斯特洞穴作为一种地下喀斯特地貌, 其特征是黑暗潮湿、相对恒定的温度和湿度、营养贫瘠、相对封闭、受外界环境的影响极小, 是极端环境生态系统。因此, 喀斯特洞穴中的生物保存

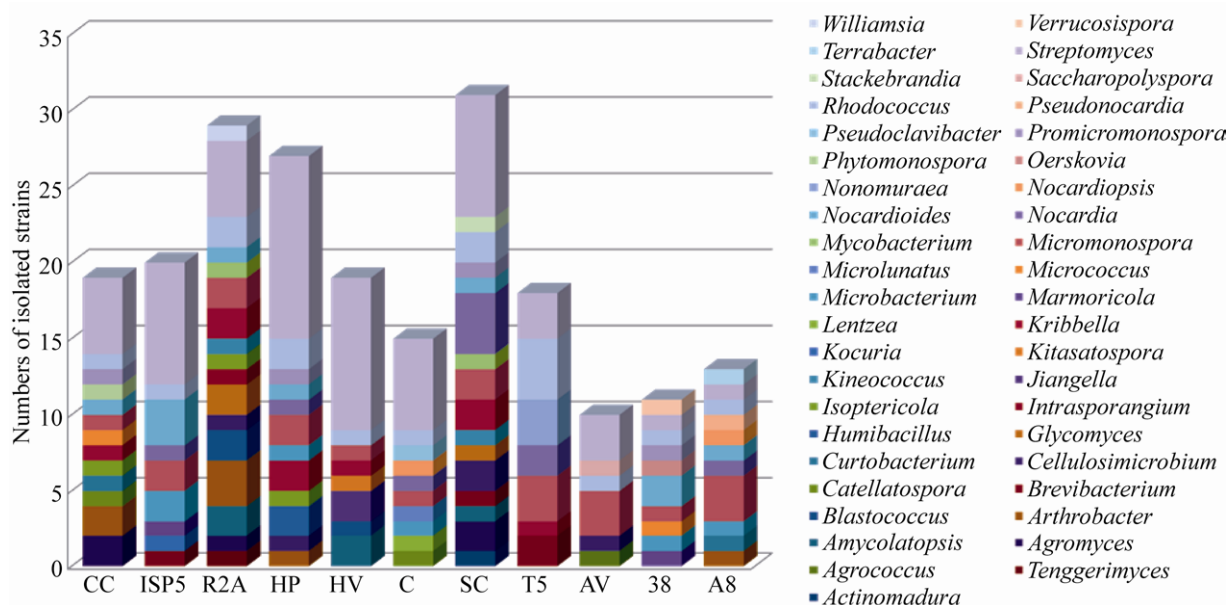


图 3. 通过不同培养基类型筛选获得的放线菌多样性比较

Figure 3. Comparison of actinobacteria diversity by different isolation medium.

表 3 35 株具有抑菌活性的放线菌分布情况
Table 3 Antimicrobial activities of actinobacteria strains

Strains	Gram-staining negative bacteria				Gram-staining positive bacteria			
	EC	AB	KP	MRPA	EF	BS	ML	MRSA
<i>Streptomyces abikoensis</i> K10138	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Rhodococcus wratislaviensis</i> K10168	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Streptomyces rectiviolaceus</i> K10185	-	-	-	-	++	-	+	+
<i>Micrococcus aloeverae</i> K10093	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Streptomyces malachitospinus</i> K10115	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Micromonospora aurantiaca</i> K10092	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Streptomyces hygrosopicus</i> K10064	-	-	-	-	+	-	++	-
<i>Streptomyces angustmycinicus</i> K10065	-	-	-	-	+	-	++	+
<i>Streptomyces peucetius</i> K10130	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Gordonia rhizosphaera</i> K20003	-	-	-	-	-	-	++	-
<i>Streptomyces maoxianensis</i> K10175	+++	+	+++	+++	++	++	+++	+++
<i>Microclunatus speluncae</i> K10189	-	-	-	+++	++	-	+++	-
<i>Streptomyces violascens</i> K20007	-	-	+++	+++	-	-	+++	-
<i>Streptomyces yunnanensis</i> K10121	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+++
<i>Streptomyces anulatus</i> KXTP10	+++	++	+++	++	++	++	+++	+++
<i>Micromonospora palomenae</i> K10136	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Nocardioides aromaticivorans</i> K58244	-	-	-	-	+	-	+	+
<i>Williamsia muralis</i> K69213	-	-	++	-	+	-	-	-
<i>Nonomuraea lactuca</i> K10068	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Nonomuraea roseoviolacea</i> K10070	-	+	-	++	-	-	-	+
<i>Nocardia aurea</i> K10002	+	-	+	-	++	++	++	+
<i>Streptomyces cavernae</i> K10008	-	-	++	+	+	+	+	-
<i>Nocardia neocaledoniensis</i> K10112	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Streptomyces cirratus</i> SYSU K10145	-	-	+	-	+	-	+	-
<i>Streptomyces malachitospinus</i> K10077	-	+	-	++	++	+	++	-
<i>Streptomyces endophyticus</i> KD2T11	+	-	+	+	++	-	+	-
<i>Streptomyces scopuliridis</i> KA1119	+	+	-	-	+	++	-	+
<i>Streptomyces peucetius</i> K10010	++	+	-	+	-	-	+	-
<i>Streptomyces netropsis</i> K10173	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Micromonospora kangleipakensis</i> K10133	-	-	-	+	+	+	++	-
<i>Micromonospora echinofusca</i> K10361	-	+	+	+	-	++	+	-
<i>Micromonospora citrea</i> K10089	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>Micrococcus flavus</i> KART04	-	-	-	+	+	-	++	+
<i>Glycomyces algeriensis</i> KA936	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Streptomyces omiyaensis</i> K10181	-	+	-	-	-	-	-	-

AB: *Acinetobacter baumannii*, KP: *Klebsiella pneumoniae*, MRPA: Multiple-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, EC: *Escherichia coli*, EF: *Enterococcus faecalis*, MRSA: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, ML: *Micrococcus luteus*, BS: *Bacillus subtilis*.
-: No activity; +: 6 mm<bacteriostatic diameters<10 mm; ++: 10 mm<bacteriostatic diameters<15 mm; +++: bacteriostatic diameters>15 mm.

了最原始的生理生化状态, 从洞穴中发现的生物极大地丰富了环境中的生物资源, 微生物新种更是在喀斯特洞穴中频繁被发现, 极大地拓展了微生物资源。朱海珍等推测, 洞穴作为一种封闭独立的生态系统, 其理化性质相对稳定, 通过比较不同洞穴的微生物组能够评估特定因素对微生物群落结构的影响, 追踪小的环境波动造成的微生物群落变化, 研究洞穴历史演化以及演化过程中微生物的作用^[28]。另外, 喀斯特洞穴微生物资源, 尤其是放线菌资源的次级代谢物的丰富性超越我们的想象, 而从喀斯特洞穴中发现更多的活性菌株并进行详细的研究将为现代医药行业潜在的新药提供物质基础。因此, 我们应加强对喀斯特洞穴这一特殊生境微生物类群的多样性研究, 尤其放线菌类群应成为后期研究重点。

参 考 文 献

- [1] Kranjc A. The origin and evolution of the term “karst”. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 2011, 19: 567–570.
- [2] Schabereiter-Gurtner C, Saiz-Jimenez C, Piñar G, Lubitz W, Rölleke S. Phylogenetic diversity of bacteria associated with paleolithic paintings and surrounding rock walls in two Spanish caves (Ilonín and la garma). *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47(2): 235–247.
- [3] Zhang YH, Zhu DH. Large karst caves distribution and development in China. *Journal of Guilin University of Technology*, 2012, 32(1): 20–28. (in Chinese)
张远海, 朱德浩. 中国大型岩溶洞穴空间分布及演变规律. 桂林理工大学学报, 2012, 32(1): 20–28.
- [4] Li DT, Luo Y. Measurement of carbonate rocks distribution area in China. *Carsologica Sinica*, 1983, 2(2): 147–150. (in Chinese)
李大通, 罗雁. 中国碳酸盐岩分布面积测量. 中国岩溶, 1983, 2(2): 147–150.
- [5] Barton HA, Jurado V. What's up down there? Microbial diversity in caves. *Microbe*, 2007, 2: 132–138.
- [6] Laiz L, Groth I, Gonzalez I, Saiz-Jimenez C. Microbiological study of the dripping waters in Altamira Cave (Santillana del Mar, Spain). *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 36(1/2): 129–138.
- [7] Ikner LA, Toomey RS, Nolan G, Neilson JW, Pryor BM, Maier RM. Culturable microbial diversity and the impact of tourism in Kartchner Caverns, Arizona. *Microbial Ecology*, 2007, 53(1): 30–42.
- [8] Ortiz M, Neilson JW, Nelson WM, Legatzki A, Byrne A, Yu Y, Wing RA, Soderlund CA, Pryor BM, Pierson III LS, Maier RM. Profiling bacterial diversity and taxonomic composition on speleothem surfaces in Kartchner Caverns, AZ. *Microbial Ecology*, 2013, 65(2): 371–383.
- [9] Quintana PG, Romero SM, Vaamonde G, Baldessari A. New metabolites of drospirenone obtained in Mucorales fungi culture. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2013, 97: 110–117
- [10] Herold K, Gollmick FA, Groth I, Roth M, Menzel KD, Möllmann U, Gräfe U, Hertweck C. Cervimycin A-D: a polyketide glycoside complex from a cave bacterium can defeat vancomycin resistance. *Chemistry A European Journal*, 2005, 11(19): 5523–5530.
- [11] Stankovic N, Radulovic V, Petkovic M, Vuckovic I, Jadranin M, Vasiljevic B, Nikodinovic-Runic J. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(5): 1217–1231.
- [12] Axenov-Gibanov DV, Voytsekhovskaya IV, Tokovenko BT, Protasov ES, Gamaiunov SV, Rebets YV, Luzhetsky AN, Timofeyev MA. Actinobacteria isolated from an underground lake and moonmilk Speleothem from the biggest conglomeratic Karstic Cave in Siberia as sources of novel biologically active compounds. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0149216.
- [13] Zhang WQ, Zhang YG, Fang BZ, Wei DQ, Han MX, Li S, Xiao M, Li WJ. Studies on diversity of culturable bacteria in karst cave soil of Xingyi, Guizhou and their protease and amylase activities. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 955–964. (in Chinese)
张万芹, 张永光, 房保柱, 魏大巧, 韩明贤, 李帅, 肖敏, 李文均. 贵州兴义喀斯特洞穴土可培养细菌多样性及其产

- 蛋白酶、淀粉酶活性筛选. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 955–964.
- [14] 李洁. 黄花蒿内生放线菌资源及其对黄花蒿生长和青蒿素生物合成的影响. 云南大学博士学位论文, 2010.
- [15] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65(5): 501–509.
- [16] Fang BZ, Salam N, Han MX, Jiao JY, Cheng J, Wei DQ, Xiao M, Li WJ. Insights on the effects of heat pretreatment, pH, and calcium salts on isolation of rare *Actinobacteria* from Karstic Caves. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1535.
- [17] Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 33(1): 17–20.
- [18] Fang BZ, Han MX, Liu L, Zhang ZT, Liu WL, Shen JT, Wang Y, Zhang WQ, Wei DQ, Li WJ. *Lentzea cavernae* sp. nov., an actinobacterium isolated from a karst cave sample, and emended description of the genus *Lentzea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(7): 2357–2362.
- [19] Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, Park SC, Jeon YS, Lee JH, Yi HN, Won S, Chun J. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(3): 716–721.
- [20] 韩明贤. 贵州典型喀斯特洞穴可培养放线菌多样性及其抗菌活性的研究. 昆明理工大学硕士学位论文, 2017.
- [21] Scientific basis and Prospect of dry salt aerosol therapy in clinical application. Sun XJ, trans. *Foreign Medical Science · Physical Medicine and Rehabilitation*, 2000, 20(4): 158–160 (in Chinese).
- 干盐气溶胶疗法临床应用的科学根据与展望. 孙星炯, 译. *国外医学·物理医学与康复学分册*, 2000, 20(4): 158–160.
- [22] Yuan Y, Duan JY, Li SH, Sun ZQ, Liu HM, Zhang MZ, Zhu L, Chen G. Application status of rock salt aerosol therapy. *Occupation and Health*, 2019, 35(3): 430–432. (in Chinese)
- 袁扬, 段建勇, 李姝华, 孙志谦, 刘红梅, 张木子, 朱丽, 陈刚. 岩盐气溶胶疗法的应用现状. *职业与健康*, 2019, 35(3): 430–432.
- [23] Pawlowski AC, Wang WL, Koteva K, Barton HA, McArthur AG, Wright GD. A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. *Nature Communications*, 2016, 7: 13803.
- [24] Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave Microbiome. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34953.
- [25] Perry JA, Westman EL, Wright GD. The antibiotic resistome: what's new? *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 21: 45–50.
- [26] Jiang ZK, Guo L, Chen C, Liu SW, Zhang L, Dai SJ, He QY, You XF, Hu XX, Tuo L, Jiang W, Sun CH. Xiakemycin A, a novel pyranonaphthoquinone antibiotic, produced by the *Streptomyces* sp. CC8-201 from the soil of a karst cave. *The Journal of Antibiotics*, 2015, 68(12): 771–774.
- [27] Cheeptham N. Cave Microbiomes: a novel resource for drug discovery. New York: Springer, 2013.
- [28] Zhu HZ, Jiang CY, Liu SJ. Cave microbiomes: the known and the unknown. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(6): 829–838 (in Chinese).
- 朱海珍, 姜成英, 刘双江. 洞穴微生物组: 已知与未知. *微生物学报*, 2017, 57(6): 829–838.

Diversity and antibacterial activity of culturable actinobacteria in karst cave soil in Xingyi, Guizhou

Wanqin Zhang¹, Baozhu Fang², Mingxian Han³, Shuai Li², Lei Dong², Hongchen Jiang³, Wenjun Li^{2*}

¹ College of Biology and Chemistry, Xingyi Normal University for Nationalities, Xingyi 562400, Guizhou Province, China

² School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong Province, China

³ State Key Laboratory of Biogeology and Environmental Geology, China University of Geosciences, Wuhan 430074, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] To investigate the diversity of culturable actinobacteria of samples from karst cave in Xingyi county of Guizhou province and analyze their ability of production of secondary metabolites. [Methods] The spread plate method was used to obtain the diversity of culturable actinobacteria from different type karst cave samples (sediment and rock) with many kinds of media. Three ferments media were selected to detect the production of secondary metabolite compounds of these culturable actinobacteria. [Results] Through the comparative analysis based on 16S rRNA gene sequences similarities, we obtained a total of 251 isolates belonging to 44 genera, among of which the genera *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, *Microbacterium* and *Nocardia* were the dominant actinobacterial group, and the proportion of them were 24.30%, 11.95%, 9.16%, 7.17% and 6.37%, respectively. During the analysis of production of bioactivity of secondary metabolite compounds, 35 isolates showed the bioactivity to the indicator pathogen bacteria, among of which were main from the genera *Streptomyces* and *Micromonospora*. [Conclusion] The results indicated that there were richness actinobacterial resources in the karst cave niche in southwest of Guizhou, and much more isolates had the ability to produce secondary metabolite compounds, which would become potential species for the pharmaceutical industry, and hence it had the most value for further exploration and research.

Keywords: karst cave, actinobacteria, biodiversity, secondary metabolite compounds

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31600103, 31600015, 31670009)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-84111727; E-mail: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

Received: 8 January 2020; Revised: 27 February 2020; Published online: 20 April 2020

张万芹, 女, 汉族, 1982年08月生, 贵州开阳人, 理学硕士, 兴义民族师范学院副教授。2008年7月毕业于贵州大学微生物学专业, 2009年1月就职于兴义民族师范学院, 2014年7月在云南大学访问学者学习1年。先后承担生物科学专业《微生物学》、《微生物学实验》和《生命科学导论》等多门课程, 指导本科毕业论文多篇。主要科研方向是药用植物内生真菌、食用菌以及喀斯特环境微生物资源的发掘与利用。主持完成贵州省教育厅自然科学研究重点项目1项, 参与完成贵州省教育厅、科技厅项目多项。在 *Int J Syst Evol Microbiol*、《微生物学通报》、《中药学》以及《贵州农业科学》等学术期刊发表学术论文多篇。



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