

## 三种动物粪便及一种虫体可培养放线菌的多样性及其生物活性

姜怡, 曹艳茹, 蔡祥凤, 徐丽华, 姜成林\*

(云南大学云南省微生物研究所, 云南省生物资源保护与利用重点实验室, 昆明 650091)

**摘要** 【目的】分析大熊猫、斑马和竹鼠粪便及竹虫的可培养放线菌多样性及其生物活性, 探索其作为资源开发利用的可能性。【方法】采集大熊猫、斑马和竹鼠的新鲜粪便及竹虫幼虫, 用 4 种培养基分离放线菌。测定代表菌株的 16S rRNA 基因序列, 并进行系统发育分析, 将菌株鉴定到属。测定了分离菌株的水解活性和多种酶活。【结果】共获得 121 株放线菌, 选取的 47 株代表菌株经系统发育分析, 被鉴定为放线菌的 9 个属。从竹鼠粪便分离到 6 个已知稀有放线菌属菌株。从其它动物粪便中共分离到 4 个可能新种。121 株菌的水解活性和酶活性不仅高且多样。部分菌株能很好的降解鸡毛和纤维素。【结论】动物粪便放线菌不仅对动物食物的消化吸收有重要作用, 也可作为探索工业产品包括酶制剂和生物活性物质的开发资源。

**关键词:** 动物粪便; 可培养放线菌; 多样性; 水解活性; 酶活性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)09-1152-06

放线菌(Actinomycetes)作为一类具有高 G + C 含量的革兰氏阳性细菌, 因其产生多样的天然产物如抗生素、酶和酶抑制剂而备受关注。至 2002 年, 22000 多种具有生物活性的次生代谢物(包括抗生素)已在科学专利和著作中发表, 其中一半由放线菌产生。现在大约有 150 种抗生素已应用于人类疾病治疗和农业上。其中放线菌产生 100 ~ 120 种(约占 75%), 其他细菌产生 10 ~ 20 种, 真菌产生 30 ~ 35 种<sup>[1]</sup>。目前, 从放线菌和其他微生物开发天然药品有三个难题。首先, 排除重复菌株及化合物非常困难; 其次, 新药开发的速度比病原菌产生抗药性的速度慢, 且新的疾病还在不断产生; 再者, 根据分子技术的研究结果, 尚有 90% ~ 99% 的微生物未能纯培养<sup>[2-3]</sup>, 要获得这些未知菌很困难。因此, 发现新菌源是解决这些难题的途径之一。

到目前为止, 微生物科学家对土壤、极端环境、海洋和植物体等各种生境的放线菌进行了大量研

究。人类及动物肠道和粪便微生物多样性也有一些研究报道<sup>[4-5]</sup>。Bik 等从 23 个人肠道样品分析了 1833 条 16S rRNA 基因序列, 结果发现 128 个类型的细菌, 包括 *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* 和 *Fusobacteria* 等门, 其中很多属于未培养的细菌<sup>[4]</sup>。Frey 等利用 T-RFLP 分析和 16S rRNA 基因克隆文库分析了大猩猩粪便的细菌多样性, 鉴定出 *Firmicutes*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Lentisphaerae*, *Bacteroidetes*, *Spirochetes* 和 *Planctomyces* 等细菌, 也有很多属于未培养细菌<sup>[5]</sup>。这些工作极大地丰富了我们对于动物肠道和粪便微生物多样性的认识, 但他们并没有获得这些微生物的纯培养物。也有不少从食草动物肠胃和粪便筛选纤维分解菌的工作<sup>[6]</sup>。但专门研究放线菌多样性的工作比较少, 尤其是把动物粪便放线菌(coprophilous actinomycetes)<sup>[7]</sup>作为一类资源进行研究的更少。

本研究分析了大熊猫、斑马和竹鼠的粪便及竹

基金项目: 国家 973 项目(2004CB719601); 国家自然科学基金(30560001); 科学技术部国际合作重点项目(2006DFA33550)

\* 通信作者。Tel: +86-871-5034139/5035263; Fax: +86-871-5173878; E-mail: lihxu@ynu.edu.cn

作者简介: 姜怡(1978-), 女, 云南人, 博士研究生, 从事放线菌资源研究, E-mail: jiangyikm@hotmail.com

收稿日期: 2009-04-13; 修回日期: 2009-06-23

虫体内放线菌多样性及其生物活性,以期作为药物先导化合物和其它活性物质的研究提供新菌源,为放线菌资源的开发利用探索一条新途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:**从昆明野生动物园采集成年健康的大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca*)、斑马(*Equus burchelli*)和竹鼠(*Rhizomys sinensis*)的新鲜粪便,分别放入无菌塑料袋中,收集竹虫(*Xylocopa dissimilis*)10条放入无菌塑料袋,存放于4℃,以备分离使用。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**溶菌酶、蛋白酶、dNTPs、*Taq* 酶等购自上海生工生物工程技术有限公司(Sangon),Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,其余试剂为国产分析纯试剂。电泳仪购自Bio-RAD公司,PCR 仪购自德国 Biometra 公司,冷冻离心机为 Beckman coulter。恒温振荡器:国华企业 THZ-82A,超声波清洗仪型号规格:SK3300H,超净工作台:苏净集团安泰公司制造。

### 1.2 分离方法

**1.2.1 分离培养基**(1)改良甘油-门冬酰胺培养基(YIM 171):甘油 10 g,门冬酰胺 1 g, $K_2HPO_4 \cdot H_2O$  1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g, $CaCO_3$  0.3 g,复合维生素 3.7 mg<sup>[8]</sup>,微量盐 1 mL<sup>[9]</sup>, $K_2Cr_2O_7$  50 mg,琼脂 15 g,pH 7.7(2)改良海藻糖-脯氨酸培养基(YIM 212)<sup>[10]</sup>,加  $K_2Cr_2O_7$  50 mg,琼脂 15 g,pH 7.2(3)纤维素琼脂培养基(YIM 56)纤维素 10 g, $MgSO_4$  0.5 g, $K_2HPO_4$  0.5 g, $KNO_3$  1 g, $NaCl$  0.5 g,复合维生素 3.7 mg,agar 15 g,pH 7.2(4)竹叶提取物培养基:将200 g竹叶煮1 h,过滤,加水至1000 mL,琼脂 15 g,pH 7.0。

**1.2.2 样品处理:**大熊猫、斑马和竹鼠的新鲜粪便分别取粪球中间样品2 g盛于18 mL无菌水中,充分搅碎,竹虫用70%的酒精表面消毒1 min,然后碾碎,取2 g盛于18 mL无菌水中。将四份样品置于振荡器120 r/min 振荡1 h,再稀释1000倍,取0.1 mL悬液涂布平板。

**1.2.3 菌株保存:**28℃培养7 d后,挑取单菌落于ISP 2<sup>[8]</sup>斜面培养基,28℃培养7 d,备用。

### 1.3 菌株鉴定

菌株总DNA提取、16S rRNA 基因的PCR 扩增、PCR 产物纯化和序列测定按文献[11]操作。扩增和测序均用细菌通用引物:正向引物 PA(8~27f 5'-A-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和反向引物 PB(1523~1504r 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')<sup>[12]</sup>。通过 Blast 程序,从 GenBank、EMBL、NCBI 等公共数据库中进行相似性搜索,调出相似性最高且是有效发表的典型菌株的序列,用 CLUSTALX 进行序列比对,系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算<sup>[13]</sup>,用 MEGA 3.1<sup>[14]</sup>的 Neighbor-joining 法构建系统进化树,重复取样1000次进行自展值(bootstrap value)分析以评估系统进化树的稳定性,最终将菌株鉴定到属的水平。对于16S rRNA 基因 PA 反应相似性低于96%的菌株进行全序列测定(约1500 bp),并做系统发育分析。

### 1.4 酶活性及水解作用测试

酶活检测采用 API ZYM 系统试剂盒(biomérieux)测试121株菌的19种酶活性。凝胶水解、纤维素水解、牛奶凝固和胨化、淀粉水解及鸡毛水解实验采用 Shirling and Gottlieb 的方法<sup>[7]</sup>。

## 2 结果

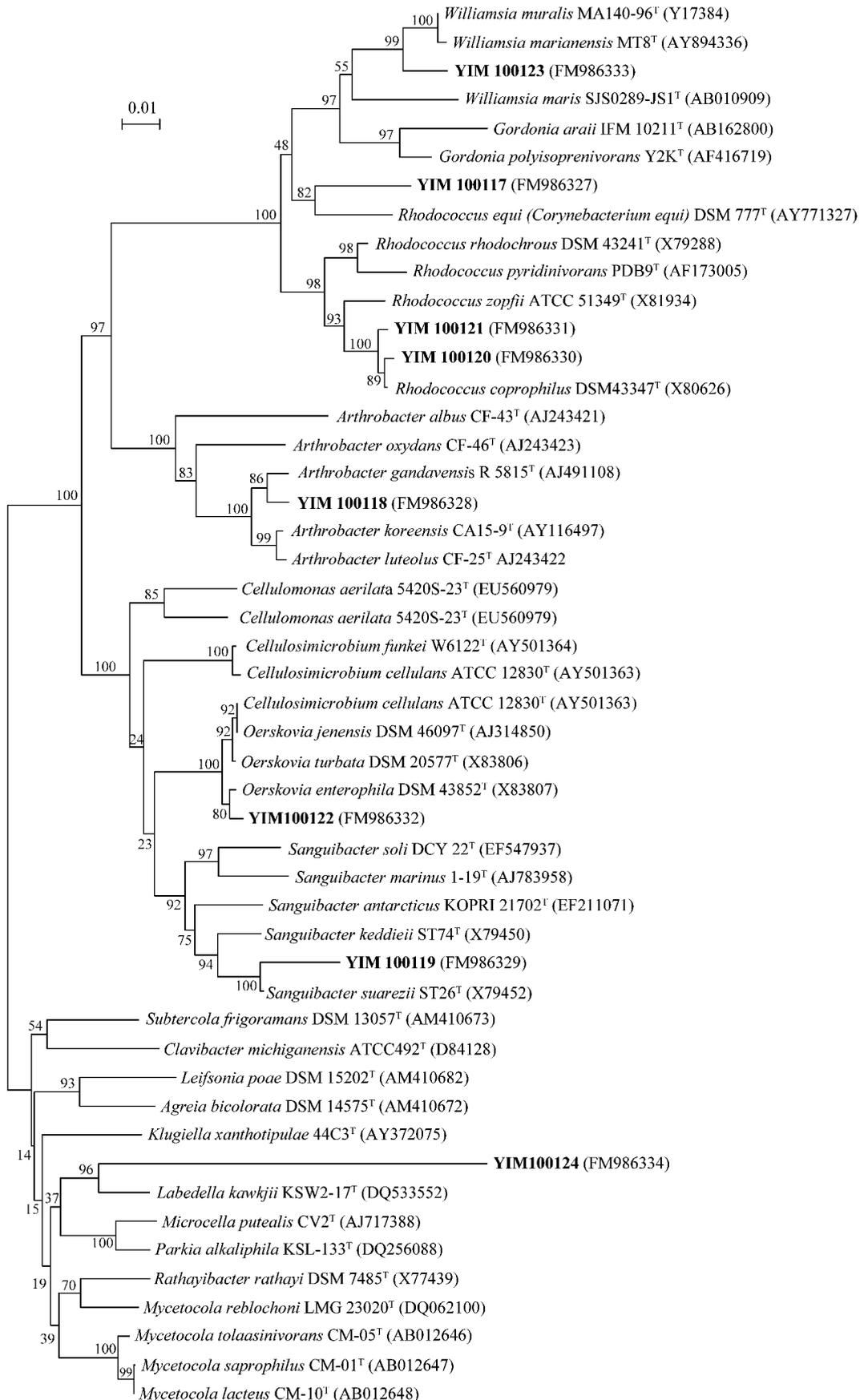
### 2.1 不同培养基的分离效果

从3种动物粪便及竹虫虫体4种样品共分离到146株放线菌,经过同一样品内去重复以后,共获得纯培养放线菌121株,四种培养基的分离结果列于表1。四种培养基分离放线菌按数量的多少顺序如下:YIM 212 > YIM 171 > YIM 56 > 竹叶提取培养基。分离效果最好的是 YIM 212,分离到66株菌;其次是 YIM 171,分离到29株,其余两个培养基的分离效果较差。从大熊猫、斑马和竹鼠粪便及竹虫分别分离到9、52、20和40株菌,以斑马粪便的放线菌最多,大熊猫的最少。

表1 四种培养基分离的放线菌菌株数

Table 1 Actinobacteria strain number isolated by the four types of media

Media	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	<i>Rhizomys sinensis</i>	<i>Equus burchelli</i>	<i>Xylocopa dissimilis</i>	Total
YIM 171	2	4	14	9	29
YIM 212	4	7	32	23	66
Cellulose agar	1	6	2	5	14
Bamboo extract agar	2	3	4	3	12
Total	9	20	52	40	121



根据 16S rRNA 基因序列构建的分离自竹鼠的菌株及其相关有效种的系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the strains from *Rhizomys sinensis* and related valid published type species based on similarity of 16S rRNA gene sequences. Bar: 1% sequence divergence. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values (> 50%) based on neighbour-joining analyses of 1000 resampled data sets. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank.

## 2.2 放线菌的组成

从获得的 121 株放线菌,根据在不同培养基的菌落形态、颜色,选择其中 47 株作为代表,测定了它们的 16S rRNA 基因部分序列,构建系统发育树。47 株菌的种属组成如下:分离自大熊猫粪便的 9 株菌,属于 2 个属的放线菌(*Streptomyces*, *Rhodococcus*);从竹鼠粪便中分离到的菌株可以归到 6 个属的放线菌(*Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Williamsia*, *Oerskovia*, *Sangubacter* 和 *Labeledella*)。菌株 YIM 100124 的 16S rRNA 基因全序列与有效种的最高相似性小于 96%, 并形成一个新的 16S rRNA 基因分支,可能是一个新属;YIM 100117 的 16S rRNA 基因全序列与 *Rhodococcus* 属内有效种的最高相似性为 96.7%, 可能是该属的一个新种(图 1)。

从斑马粪中分离到 3 个属的放线菌(*Streptomyces*, *Microbacterium*, *Mycobacterium*)。在 YIM 212 培养基上,有大约  $176 \times 10^5$  cfu/g 的 *Microbacterium oxydans* 生长,为斑马粪便的优势放线菌类群。

从竹虫体内只分离到 1 个属的放线菌

(*Microbacterium*), YIM 100138 和 YIM 100142 的 16S rRNA 基因全序列与对应属内的有效种的最高相似性都低于 97.0%, 可能为 2 个新种。虽然放线菌的多样性相对单调,但新种占的比例却比较大。

## 2.3 酶活性

采用 API ZYM system 试剂盒测定了 121 株菌的 19 种酶的活性(表 2)。从竹虫体内分离到的 40 株菌中,碱性磷酸盐酶(Alkaline phosphatase)、酯酶 C4 (Esterase (C4))、类脂酯酶 C8 (Esterase lipase (C8))、缬氨酸芳胺酶(Valine arylamidase)、酸性磷酸酶(acid phosphatase)和萘酚-AS-BI-磷酸水解酶(naphthol-AS-BI-phosphohydrolase)的酶活都呈阳性;分离自大熊猫的 9 个菌株,碱性磷酸酯酶和酸性磷酸酯酶都呈阳性;所有 20 株来自竹鼠的菌株都有亮氨酸芳胺酶(Leucine arylamidase)和  $\alpha$ -葡萄糖苷酶( $\alpha$ -glucosidase)活性,超过 50% 的菌株有碱性磷酸盐酶、酸性磷酸酶、萘酚-AS-BI-磷酸水解酶、 $\alpha$ -半乳糖苷酶( $\alpha$ -galactosidase)和  $\beta$ -葡萄糖苷酶( $\beta$ -glucosidase)酶活,但没有  $\beta$ -糖醛酸苷酶( $\beta$ -glucuronidase)酶活。

表 2 ZYM system 试剂盒测定酶活呈阳性的放线菌菌株数

Table 2 No. of Positive Isolates for Enzyme Activity by using API ZYM system

Anzyme	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	<i>Rhizomys sinensis</i>	<i>Equus burchelli</i>	<i>Xylocopa dissimilis</i>	Total
Control	0	0	0	0	0
Alkaline phosphatase	0	18	20	40	78
Esterase (C4)	9	14	14	40	77
Esterase lipase (C8)	2	19	19	40	80
Lipase (C14)	3	4	4	29	40
Leucine arylamidase	0	20	23	38	81
Valine arylamidase	6	7	7	40	60
Cystine arylamidase	1	5	5	29	40
Trypsin	0	5	5	11	21
$\alpha$ -chymotrypsin	0	11	11	1	23
acid phosphatase	0	18	18	40	76
naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	9	18	18	40	85
$\alpha$ -galactosidase	8	7	7	1	23
$\beta$ -galactosidase	0	9	9	4	22
$\beta$ -glucuronidase	0	0	0	0	0
$\alpha$ -glucosidase	0	20	23	31	74
$\beta$ -glucosidase	5	19	21	31	76
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	4	13	13	0	30
$\alpha$ -mannosidase	1	1	1	0	3
$\alpha$ -fucosidase	0	1	1	0	2

## 2.4 水解活性

水解活性的测定结果示于表 3。分离自大熊猫粪便的 9 株菌,有 7 株明胶液化呈阳性,其中 6 株活性较高,3 株水解淀粉,5 株水解鸡毛,其中 3 株水解活性高。从竹鼠粪便中分离的 20 个菌株,6 株明胶液化呈阳性,且活性都较高;有 3 株能凝固、胨化牛

奶,6 株能水解淀粉,其中一株活性高,2 株可水解鸡毛,其中 YIM 100135(*Streptomyces gougerotii*)活性很高(图 2)。从斑马粪便中分离到的 52 株菌中,有 4 株明胶液化呈阳性,且活性都较高;6 株可水解淀粉,其中 5 株活性高;1 株水解鸡毛,1 株(YIM 100118 *Arthrobacter* sp.)可水解纤维素且活性很高

(图3)。分离自竹虫的40株菌,全部不能水解纤维素,7株明胶液化呈阳性,且活性都较高。

表3 水解呈阳性的放线菌菌株数

Table 3 No. of Positive Isolates for Hydrolyzation Activity

Hydrolyzation	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	<i>Rhizomys sinensis</i>	<i>Equus burchelli</i>	<i>Xylocopa dissimilis</i>
Gelatin liquification	7	6	4	7
Cellulose degradation	0	0	1	0
Milk coagulation	4	4	5	3
Milk peptonization	2	3	5	1
Starch Hydrolyzation	3	6	6	2
Chicken feather degradation	5	2	1	0

菌则是优势菌<sup>[16-18]</sup>;植物内生菌也是以链霉菌为优势菌<sup>[19]</sup>。在本研究中,只从大熊猫和斑马的粪便分离到4株链霉菌,其它两种动物则未分到该类群;4种动物样品都没有获得小单孢菌类群。可见,动物粪便放线菌的主要类群与土壤、水生环境、植物体都有很大的不同。47个菌株中,根据16S rRNA基因全序列分析(1400 bp以上)结果,有3株可能被鉴定为新种,1株可能是新属,可见动物粪便存在很高比例的未知类群的放线菌。我们相信,通过改进分离方法,能够获得更多的未知放线菌。这些未知类群是发现新活性物质的重要研究材料<sup>[20]</sup>。

121株放线菌普遍具有酶活性和水解活性,所有菌株 Alkaline phosphatase, Esterase (C4), Esterase lipase (C8), Leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase,  $\alpha$ -glucosidase 等7种酶的阳性率都超过50%,难分解物质(如纤维素、鸡毛)也能被它们分解。这不但表明这些放线菌在食物的消化、吸收中发挥作用,而且也可以被开发和利用。因此,动物粪便放线菌可能是开发工业用酶的来源之一,也可能被用于废物处理。

地球上数百万种动物,其中哺乳动物就有大约5000种。我们初步认为,动物粪便放线菌可能是潜力较大、种类丰富,未知菌多的待开发资源;而且,从动物粪便放线菌获得的天然产物,应该对人畜更为安全。因此,动物粪便放线菌在微生物药物、酶制剂开发及废物处理中可能有着广阔的应用前景,其基础研究及开发利用应得到更多的重视。

## 参考文献

- [1] Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1):1-26.
- [2] 焦瑞身. 新世纪微生物学者的一项重要任务-未培养微生物的分离培养. *生物工程学报(Chinese Journal of Biotechnology)* 2004, 20:641-645.
- [3] Zengler K, Toledo G, Rappe M, et al. Cultivating the uncultured. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002, 99(24):15681-15686.
- [4] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 2005, 308:1635-1638.
- [5] Frey JC, Rothman JM, Pell AN, et al. Fecal bacterial diversity in a wild gorilla. *Applied and Environment Microbiology*, 2006, 72:3788-3792.
- [6] 荣华, 邱成书, 胡国全, 等. 一株大熊猫肠道厌氧纤维素菌的分离鉴定、系统发育分析及生物学特性的研究. *应用与环境生物学报(Chinese Journal of Applied & Environmental Biology)* 2006, 14:239-242.

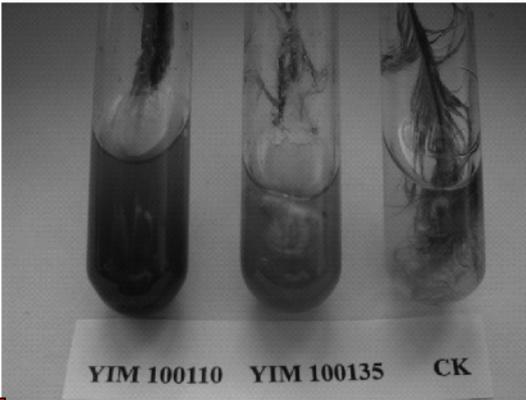


图2 YIM 100135 水解鸡毛及对照

Fig.2 Hydrolyzation of chicken feather by YIM 100135 and control (CK).

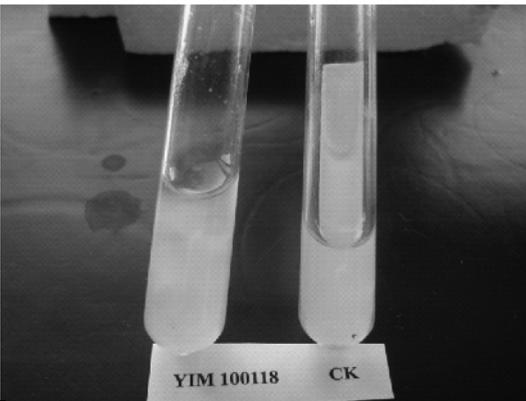


图3 YIM 100118 水解纤维素及对照

Fig.3 Degradation of cellulose by YIM 100118 and control (CK).

## 3 讨论

上述结果表明,各种动物粪便的放线菌组成各不相同。从斑马粪便分离到52株纯培养放线菌,但组成却比较单调,仅有3个属;从竹鼠分离到20株放线菌,分属于6个属,包括罕见的 *Oerskovia*, *Williamsia*, *Sanguibacter*, *Labedella*。链霉菌是土壤生态系统中的优势放线菌<sup>[15]</sup>;而在水环境中,小单孢

- [ 7 ] Hayashida S ,Nanri N ,Teramoto Y , et al. Identification and Characteristics of Actinomycetes Useful for Semicontinuous Treatment of Domestic Animal Feces. *Applied and Environment Microbiology* ,1988 ,54 :2058 – 2063 .
- [ 8 ] Hayakawa M ,Nonomura H. Humic acid-vitamin agar ,a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation and Bioengineering* ,1987 ,65 :501 – 509 .
- [ 9 ] Shirling EB ,Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces species. *International Journal of Systematic Bacteriology* ,1966 ,16 :313 – 340 .
- [ 10 ] 姜怡 ,段淑蓉 ,唐蜀昆 ,等. 稀有放线菌的分离方法. *微生物学通报( Microbiology )* ,2006 ,33 :181 – 183 .
- [ 11 ] Jiang Y ,Wiese J ,Tang SK , et al. *Actinomycetospora chiangmaiensis* gen. nov. ,sp. nov. ,a new member of the family Pseudonocardiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* ,2008 ,58 :408 – 413 .
- [ 12 ] 陈义光 ,李汇明 ,李沁元 ,等. 一平浪盐矿古老岩盐沉积中可培养细菌的系统发育多样性研究. *微生物学报( Acta Microbiologica Sinica )* ,2007 ,47 :571 – 577 .
- [ 13 ] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* ,1980 ,16 :111 – 120 .
- [ 14 ] Saitou N. ,Nei M. The neighbor-joining method :a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution* ,1987 ,4 :406 – 425 .
- [ 15 ] Xu LH ,Li QR ,Jiang CL. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan ,China. *Applied and Environment Microbiology* ,1996 ,62 :244 – 248 .
- [ 16 ] Bredholdt H ,Galatenko OA ,Engelhardt K , et al. Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord , Norway : isolation , diversity and biological activity. *Environmental Microbiology* ,2007 ,9 :2756 – 2764 .
- [ 17 ] Jiang CL ,Xu LH. Diversity of aquatic actinomycetes in lakes of the Middle Plateau ,Yunnan ,China. *Applied and Environment Microbiology* ,1996 ,62 :249 – 253 .
- [ 18 ] Jiang Y ,Wiese J ,Xu LH , et al. Marine actinobacteria ,an important source of novel secondary metabolites with bioactivities. *Chinese Journal of Antibiotics* ,2007 ,32 :705 – 722 .
- [ 19 ] Cao L ,Qiu Z ,You J , et al. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* ,2005 ,247 :147 – 152 .
- [ 20 ] 姜怡 ,徐平 ,姜恺 ,等. 放线菌药物资源开发面临的问题和对策. *微生物学通报( Microbiology )* ,2008 ,35 :272 – 274 .

## Diversity and bioactivities of cultured actinomycete isolated from animal feces and *Xylocopa dissimilis*

Yi Jiang ,Yanru Cao ,Xiangfeng Cai ,Lihua Xu\* ,Chenglin Jiang\*

( Yunnan Institute of Microbiology ,The National Engineering Center for Research of Microbial Pharmaceuticals ,Yunnan University ,Kunming 650091 ,China )

**Abstract [ Objective ]** To study the diversity and bioactivities of cultured actinomycete from feces of *Ailuropoda melanoleuca* , *Equus burchelli* and *Rhizomys sinensis* and *Xylocopa dissimilis* body. **[ Methods ]** Fresh feces samples of animals ' and *Xylocopa dissimilis* were collected. We used four media to isolate the actinomycete. Strains were identified by phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences. Hydrolyzation and enzyme activities of isolates were examined. **[ Results ]** Actinomycetes ( 121 ) from the samples were isolated on four media. Among them 47 strains belonged to 9 actinomycetes genera. Six known rare genera and one possible new genus of actinomycetes from *Rhizomys sinensis* were identified. Three possible new species from other three samples were identified. Some strains could hydrolyze chicken feather and cellulose. **[ Conclusion ]** It is considered that the coprophilous microorganisms not only have important function on the digestion and absorption of animal feed ,but also are important resource for development of industrial products ,including enzyme and bioactive metabolites.

**Keywords :** animal feces ; cultured Actinomycete ; diversity ; hydrolyzation ; enzyme activity

( 本文责编 :张晓丽 ,谷志静 )

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development ( 2004CB719601 ) ,the National Natural Science Foundation of China ( 30560001 ) and the International Cooperative Program of Ministry of Science of Technology of China ( 2006DFA33550 )

\* Corresponding authors. Tel : + 86-871-5035263/5034139 ; Fax : + 86-871-5173878 ; E-mail : lihxu@ynu.edu.cn

Received : 18 March 2009 / Revised : 23 June 2009