

DOI: 10.5846/stxb201303240500

于基成, 刘秋, 邵阳, 刘长建, 闫建芳, 齐小辉. 大连海域沉积物中可培养海洋链霉菌活性及其多样性. 生态学报, 2014, 34(20): 5896-5906.

Yu J C, Liu Q, Shao Y, Liu C J, Yan J F, Qi X H. Activity and diversity of culturable *Streptomyces* isolated from marine sediments of sea areas of Dalian. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(20): 5896-5906.

大连海域沉积物中可培养海洋链霉菌活性及其多样性

于基成, 刘秋*, 邵阳, 刘长建, 闫建芳, 齐小辉

(大连民族学院 生命科学学院, 大连 116600)

摘要:以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和尖孢镰刀枯萎病菌作为测试靶目标,采用 9 种分离培养基从大连海域 13 个不同采样点的海洋沉积物样品中分离到 165 株海洋链霉菌。从 165 株海洋放线菌中筛选到对金黄色葡萄球菌具有抑制活性的菌株 85 株,占总菌株数的 51.5%;对大肠杆菌具有抑制活性的菌株 27 株,占总菌株数的 16.4%;对尖孢镰刀枯萎病菌具有抑制活性的菌株仅有 6 株,占总菌株数的 3.6%。因此,海洋链霉菌的活性更多地表现为对细菌的抗性,尤其对革兰氏阳性细菌具有更高的抑制活性。对其中具有抑制活性或形态独特的菌株进行了 16S rDNA 序列分析,并构建系统发育树,显示活性海洋链霉菌具有丰富的种类多样性和广谱抗菌活性。同种海洋链霉菌与土壤链霉菌活性比较结果也表明,海洋链霉菌多表现抗革兰氏阳性细菌活性。**关键词:**海洋链霉菌;种群多样性;活性

Activity and diversity of culturable *Streptomyces* isolated from marine sediments of sea areas of Dalian

YU Jicheng, LIU Qiu*, SHAO Yang, LIU Changjian, YAN Jianfang, QI Xiaohui

Dalian Nationalities University, College of Life Science, Dalian 116600, China

Abstract: Actinomycetes are an important source of microorganisms used in medicine. Tens of thousands of biologically active substances of microbial origin have been found, about 45% of which are produced by actinomycetes. The marine environment has high salinity, high pressure, low temperature, low nutritive content and other characteristics, so that the population characteristics and metabolic pathways of marine actinomycetes are different from those of terrestrial actinomycetes, and can be a source of novel species and metabolites. In total, 165 antimicrobial isolates were screened from 13 marine sediment samples collected in the seas around Dalian using nine different media. The results showed that improved humic acid vitamin agar medium (HV-2) and glycerol arginine agar medium (M2) were the best types of medium for isolating marine actinomycetes, followed by improved LSE-SE-2 agar medium (LSE-SE-2) and oat agar medium (OM). Using agar block methods, the antagonistic activity of the 165 strains against three pathogens (*Fusarium oxysporum* f sp. *cucumarinum*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) was analyzed *in vitro*. Among the 165 isolates, 95 strains showed antagonistic activity against these three test pathogens. Of the 165 isolates, 85 (51.5%) strains showed activity against *S. aureus*. The diameter of the inhibition zone of four of the 85 strains was more than 30 mm; 27 strains (16.4% of the total isolates) showed activity against *E. coli*, and the diameter of the inhibition zone of strains YH6 and YH21 against *E. coli* was more than 27mm. Six strains (M95, M108, HV14, HL9, HE16, HE66), 3.6% of the total isolates, showed activity against *F. oxysporum* f sp. *cucumarinum*. The results indicated that marine actinomycetes often show antagonistic activity against bacteria, especially Gram-positive bacteria. Meanwhile, 16S rDNA sequences of interesting strains with either special

基金项目:国家自然科学基金(31070005, 31270057);中央高校基本科研业务费专项资金资助(DC12010103)

收稿日期:2013-03-24; 修订日期:2014-08-02

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liuqiu@dlmu.edu.cn

phenotypes or strong antimicrobial activity were analyzed. Phylogenetic analysis using 16S rDNA sequencing revealed that marine *Streptomyces* showed abundant species diversity and broad activity. Apart from the hygroscopicus group, 95 marine *Streptomyces* showed antagonistic activity covering all groups of *Streptomyces*. The 95 marine *Streptomyces* belong to different groups such as the roseosporus group, golden group, albosporus group, cinereus group, yellow group, blue group, lavendulae group, black group, griseorubroviolaceus group, griseofuscus group and green group. According to the SciFinder substances library, the biological activity of recorded species from the NCBI library, which had sequences approximately homologous to the 95 marine *Streptomyces* isolates, was analyzed. The 95 marine *Streptomyces* showed bioactivity, but 23 strains among the recorded species failed to exhibit activity against the pathogens. Meanwhile, 13 isolates from the 95 marine *Streptomyces* exhibited bioactivity, whereas the 13 corresponding recorded species failed to exhibit activity. This suggested that different habitats give the same species different activities. The same species isolated from marine sediments and soil showed different activities. *Streptomyces* species from marine sediments often showed antagonistic activity against Gram-positive bacteria, and had low antagonistic activity against fungi and Gram-negative bacteria. Through the analysis of the antagonistic activity of marine *Streptomyces*, the results will help researchers to improve our understanding of microbial diversity, and the isolates obtained will also help us to search for metabolites with novel activity.

Key Words: marine *Streptomyces*; species diversity; activity

放线菌是一类非常重要的药源微生物,目前已发现的数万种微生物来源的生物活性物质中,约有45%是由放线菌产生的^[1]。海洋环境所具有的高盐度、高压、低温和低营养等特点,因此海洋放线菌具有不同于陆生放线菌的种群特点和独特的代谢途径,使其成为新型放线菌和放线菌代谢产物的重要新资源^[2-3]。

自从1926年Aronson首次描述了海洋放线菌 *Mycobacterium marinum* 新种开始,人们陆续从海洋环境中分离筛选到多种海洋放线菌^[4]。但筛选到的海洋放线菌仍和陆地放线菌相似,以 *Streptomyces*、*Micromonospora* 和 *Rhodococcus* 数量最多。尤其是海洋链霉菌,仍是海洋放线菌中的主要类群。近年来的研究也表明,从海洋放线菌中发现结构新颖并具有强生理活性的物质已达100多个,其中90%以上产生于链霉菌属^[5]。但目前对海洋放线菌活性的研究多集中筛选新型放线菌种群或针对某一菌株进行活性代谢产物的分离纯化、结构分析以及功能性评价等,以期获得新型化合物。但对海洋放线菌整体活性的统计分析报道较少。本文以海洋链霉菌作为研究对象,分别以植物病原真菌、革兰氏阴性和阳性细菌作为指示菌,通过对海洋链霉菌活性分析,拟分析海洋链霉菌的抑菌活性特点,为目标性开发利用海洋放线菌资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品的采集

于大连的泊石湾、王家庄、杏树屯、小窑湾、大连湾、拉树房、毛莹子、庄河花园村、龙王塘西村附近海域,采用抓斗式采样器采集海洋沉积物样品。采集后的样品用冰盒保存并立即带回实验室进行海洋放线菌菌株的分离。

1.2 抗菌活性筛选指示菌及土壤链霉菌

分别以大肠杆菌 (*Escherichia coli*),金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* F. sp. *cucumarinum*) 作为指示菌。所有指示菌均来自于大连民族学院生命科学学院放线菌资源与应用实验室。试验所用土壤链霉菌(表1)菌株编号分别为 H86、K1、LQ1、LQ23、LQ37、LQ69、LQ137、M3、M5、V6、R11、高30和高F-9,均为大连民族学院生命科学学院放线菌资源与应用实验室分别从温室土壤和大田作物土壤分离筛选及鉴定获得。

1.3 分离培养基及海洋放线菌的分离

以常用的陆生和海洋放线菌分离培养基作为基础培养基^[6-8],并进行适当的改良。各种培养基的配方见表1。分别称取各海洋沉积物样品5g,转入装有45mL无菌天然海水的150mL三角瓶中,将三角瓶置55℃水浴锅中加热6min。然后采用稀释分离

法分别涂布于9种培养基上。28℃下培养5—15 d。根据菌落形态,挑选类似链霉菌的菌株,分别初步统计各培养基中分离获得的链霉菌菌株数目。

1.4 放线菌 16S rRNA 基因序列分析

根据形态差异,对分离获得的放线菌通过 16S rRNA 基因序列分析进行初步鉴定。采用微波法提取分离到的放线菌基因组 DNA,PCR 扩增后,进行 16S rRNA 基因序列分析。所用引物为细菌通用引物^[9],由上海生工合成。

F27: 5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3';

R1492: 5'-TACCTTGTACGAC TT-3'。

1.5 可培养海洋放线菌的抗菌活性筛选

将分离的海洋放线菌分别接种于用天然海水和蒸馏水配制的高氏 I 号培养基,28℃培养 10—14 d (不同菌株的培养时间不同),用打孔器切下直径约为 1 cm 菌饼,测定其抑菌活性^[10]。细菌在 37℃ 培养 24h,真菌在 28℃ 培养 72 h 后,观察并测量抑菌圈直径的大小,进行记录。

1.6 海洋链霉菌的活性比较

1.6.1 不同种海洋链霉菌的活性分析

参照 1.5 抗菌活性测定方法,比较海洋链霉菌的抑菌活性。

表 1 海洋放线菌分离培养基

Table 1 Isolation medium for marine actinomycetes

培养基名称 Medium name	培养基组分 Medium components
高氏 I 号培养基 Gause No.1 medium (GM)	可溶性淀粉 20 g, KNO ₃ 1 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.5 g, FeSO ₄ 0.01 g, 琼脂 20 g, 天然海水定容至 1000 mL, pH 7.2
甘油精氨酸培养基 Glycerol arginine medium (M2)	甘油 5 mL, 精氨酸 0.5 g, K ₂ HPO ₄ 1 g, MgSO ₄ 0.5 g, 琼脂 18 g, 天然海水定容至 1000 mL, pH 7.2
M13 培养基 M13 medium	酵母浸出粉 4 g, 可溶性淀粉 15 g, K ₂ HPO ₄ 1 g, MgSO ₄ 0.5 g, 琼脂 18 g, 天然海水定容至 1000 mL, pH 7.2
燕麦琼脂培养基 Oat agar medium (OM)	燕麦粉 20 g, 微量盐溶液 1 mL, 琼脂 18 g, 天然海水定容至 1000 mL, pH 7.2
葡萄糖天冬氨酸培养基 Glucose aspartic acid medium (GAM)	葡萄糖 10 g, 天冬氨酸 0.5 g, K ₂ HPO ₄ 0.5 g, 琼脂 15 g, 天然海水定容至 1000 mL, pH 7.2
腐殖酸维生素培养基 Humic acid vitamin medium (HV-1)	腐殖酸 1.0 g, CaCO ₃ 0.02 g, Na ₂ HPO ₄ 0.5 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.5 g, KCl 1.7 g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01 g, VB 母液 1 mL, 天然海水定容至 1000 mL, pH 7.2
改良腐殖酸维生素培养基 Improved humic acid vitamin medium (HV-2)	虾皮壳 2 g, 腐殖酸 1 g, CaCO ₃ 0.02 g, Na ₂ HPO ₄ 0.5 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.5 g, KCl 1.7 g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01 g, VB 母液 1 mL, 天然海水定容至 1000 mL, pH 7.2
改良 LSE-SE-1 培养基 Improved LSE-SE medium-1 (LSE-SE-1)	虾皮壳 2 g, CaCO ₃ 0.02 g, Na ₂ HPO ₄ 0.5 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.5 g, KCl 1.7 g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01 g, VB 母液 1 mL, 天然海水定容至 1000 mL, pH 7.2
改良 LSE-SE-2 培养基 Improved LSE-SE medium-2 (LSE-SE-2)	虾皮壳 2 g, 豆饼粉 0.2 g, CaCO ₃ 0.02 g, Na ₂ HPO ₄ 0.5 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.5 g, KCl 1.7 g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.01 g, VB 母液 1 mL, 天然海水定容至 1000 mL, pH 7.2

V_B母液:维生素 B1、核黄素、烟酸、维生素 B6、肌醇、泛酸、对氨基苯酸各 0.1 g,生物素 0.05 g,去离子水定容至 100 mL;微量盐溶液:FeSO₄ · 7H₂O、MnCl₂ · 4H₂O、ZnSO₄各 0.1 g,去离子水定容至 100 mL

1.6.2 活性海洋链霉菌物种系统发育分析

将有抗菌活性的放线菌的 16S rDNA PCR 扩增产物测序,测序结果提交到 NCBI 的 GeneBank 数据库,并利用 Blast 软件和 MEGA 软件构建活性海洋放线菌及其相似种的系统发育树,分析具有活性海洋放线菌种群多样性。同时,利用 SciFinder 物质数据库查询同源种的生物活性物质情况,分析获得的海洋链霉菌潜在的生物活性物质。

1.7 同种海洋链霉菌与土壤链霉菌的活性比较

按照 1.5 抗菌活性测定方法,比较本实验分离到的海洋链霉菌和来自土壤的同种链霉菌的抑菌活性。同时以 50%海水配制的高氏 I 号培养基培养土

壤链霉菌后,以同种的海洋链霉菌为对照,比较其抑菌活性。分析相同培养条件下同种不同来源的链霉菌的抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对海洋放线菌的分离效果

利用 9 种培养基共分离获得放线菌 165 株(图 1)。结果表明,分离效果较好的培养基是改良 LSE-SE-2 培养基(LSE-SE-2)和燕麦琼脂培养基(OM)。但细菌在这两种培养基上生长迅速,影响后期放线菌的分离纯化。培养基甘油精氨酸培养基(M2)中有放线菌偏好的两种营养成分甘油和精氨酸,分离

效果也较好,且污染较少。培养基改良腐殖酸维生素培养基(HV-2)分离的放线菌数目较LSE-SE-2少,但培养基受污染程度小,放线菌的检出率最高,是一种高效的分离培养基。高氏I号培养(GM)、葡萄糖天冬氨酸培养基(GAM)和腐殖酸维生素培养基(HV-1)也获得一定量的放线菌种群。HV-1、M13培养基上只分离到了少量海洋放线菌。因此,HV-2和M2是两种高效分离海洋放线菌的培养基,其次为LSE-SE-2和OM培养基。

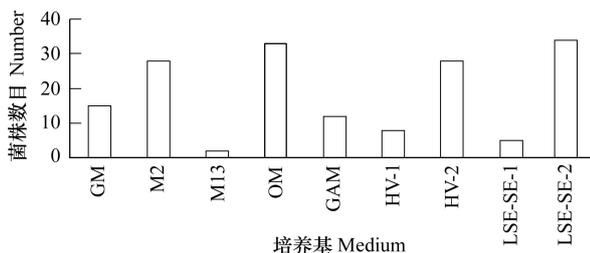


图1 不同培养基对海洋放线菌的分离效果

Fig.1 The separation effect for marine actinomycetes on different medium

图中字母均为各培养基名称简写,如GM为高氏I号培养基名称简写,其余与表1所列培养基一致

2.2 放线菌的初步鉴定

根据形态特征及其放线菌的16S rDNA基因序列分析,经排重,共获得165株放线菌,其中7株为拟诺卡氏菌(*Nocardopsis* sp.),其余158株全部为链霉菌,部分菌株NCBI登录号为HQ696525—HQ696549, HM007148—HM007161, HM209312—HM209318。

2.3 可培养海洋放线菌的抗菌活性分析

采用琼脂块法对分离到的海洋放线菌分别进行抗金黄色葡萄球菌、大肠杆菌以及尖孢镰刀菌活性试验,结果表明,分离获得的158株海洋链霉菌中,95株菌株分属不同的链霉菌种,且表现不同的抗菌活性。不同种的链霉菌中,85株放线菌对金黄色葡萄球菌具有抗菌活性,占总分菌数的51.5%;其中抑菌圈直径大于30mm的菌4株。27株放线菌对大肠杆菌具有抗菌活性,占总分菌数的16.4%。其中抑菌圈直径为27mm的菌株编号分别为YH6和YH21,对尖孢镰刀菌有活性的菌株分别为M95、M108、HV14、HL9、HE16、HE66,仅占总分菌数的3.6%。由图2可见,海洋放线菌更多地显示抗金黄色葡萄球菌的活性,且高活性菌株也多表现抗金黄色葡萄球菌。另外,27株表现抗大肠杆菌活性的菌

株中有23株同时表现抗革兰氏阳性菌活性,6株抗尖孢镰刀菌活性的菌株也均同时具有抗革兰氏阳性菌活性。

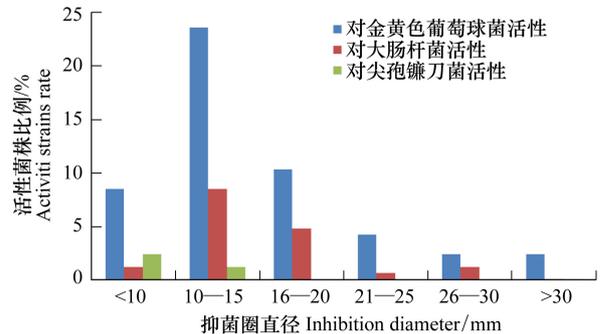


图2 海洋放线菌对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌以及尖孢镰刀菌抑菌活性比较

Fig.2 Antagonism comparison of marine actinomycetes against *F. oxysporium* f. sp. *cucumarinum*, *S. aureus* and *E. coli*

2.4 活性海洋放线菌的系统发育分析

以上拮抗放线菌及再利用Blast软件从GenBank, EzTaxon server 2.1数据库中搜索出的亲缘关系近的已报道菌株为基础,分别构建不同拮抗活性菌株的系统发育树,分析拮抗海洋放线菌多样性(图3和图4)。可以看出,拮抗海洋放线菌涵盖链霉菌各个类群如粉红孢类群、金色类群、白孢类群、烬灰类群、黄色类群蓝色类群、淡紫灰类群、青色类群、灰红紫类群、灰褐类群和绿色类群,而7种拟诺卡氏菌独立成支。

同时,根据各分离菌株的16S rDNA序列及其生理生化特性,确定各分离菌株的同源近似种(表2)。结合分离菌株对革兰氏阴性细菌、阳性细菌和植物病原真菌的抑菌活性测定结果,比较SciFinder物质数据库报道的各同源近似种的生物活性。结果表明,95株分离菌株中具有抑菌活性,而其同源近似种未见活性报道的有24株。在24株分离菌株中,其中23株均表现抑制金黄色葡萄球菌活性,且10株同时表现抑制大肠杆菌活性;菌株PH26仅表现抑制大肠杆菌活性,菌株M95、HE66同时表现抑制尖孢镰刀菌活性,HV14对3种指示菌均表现抑菌活性(表2)。在95株分离菌株中,其近似同源种报道具有生物活性,而分离菌株未检测出相应活性的有13株,近似同源种报道的具有抑制革兰氏阴性菌活性,而分离菌株未检出相应活性的9株,同源近似种报道的具有抑制丝状真菌活性,而分离菌株未检出相

应活性的 2 株(HE11、HE71)。

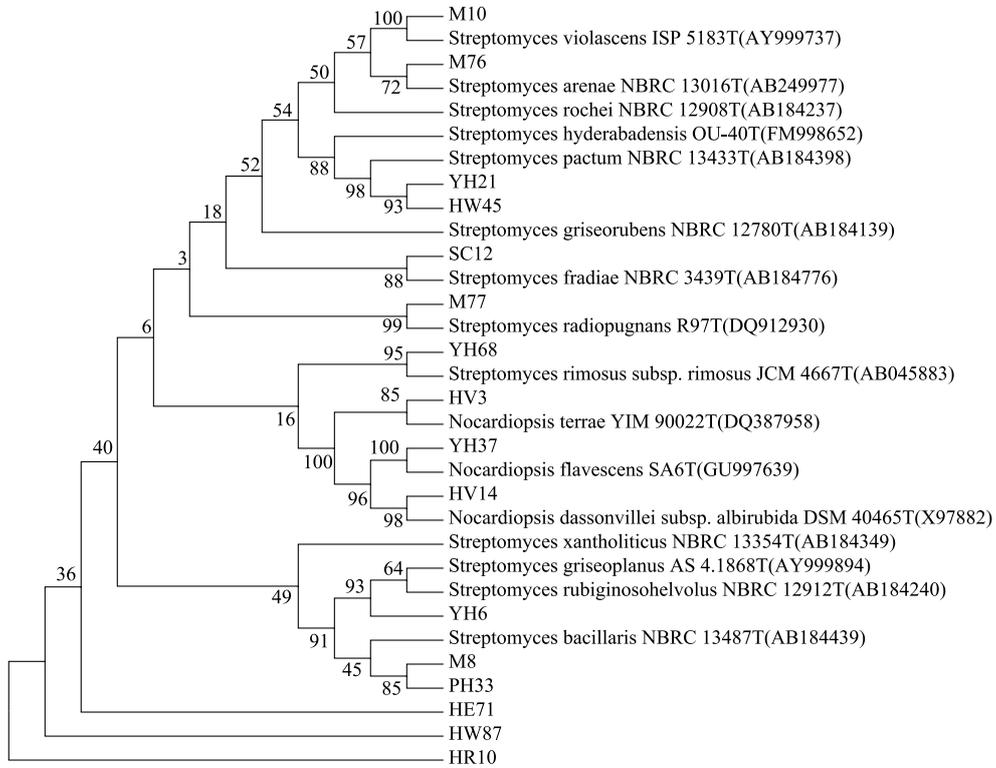


图 3 拮抗大肠杆菌的海洋放线菌种群多样性分析

Fig.3 Species diversity analysis of antagonistic marine actinomycetes against *E. coli*

图中字母+数字如 M10、YH21 等为分离的海洋放线菌菌株编号

表 2 分离菌株及其相似菌株的同源性分析和活性比较

Table 2 Homology analysis and activity comparison for isolates and similar strains

菌株名称 Strain name	分离菌株的抑菌活性*			同源近似种 Homologous species	相似率/% Similarity rate	同源种的生物活性*
	E_s^{Δ}	St	Fu			
HA1	—	30	—	<i>S. malachitofuscus</i>	99.156	抑制金黄色葡萄球菌
HA2	—	39	—	<i>S. diastaticus</i>	100.000	拮抗性有限,轻度抑制芽孢杆菌
HA5	—	37	—	<i>S. matensis</i>	98.875	产生抗革兰氏阳性菌的马塔霉素(Matamycin)
HA9 [●]	—	—	—	<i>S. corchorusii</i>	100.00	抑制真菌、革兰氏阳性菌
HA14	—	—	—	<i>S. mexicanus</i>	99.697	未见报道
HA15	—	—	—	<i>S. tricolor</i>	99.789	未见报道
HB2	—	—	—	<i>S. coerulescens</i>	99.472	抑制小球藻
HB3 [#]	—	10	—	<i>S. sampsonii</i>	99.699	未见活性报道
HB12 [●]	—	—	—	<i>S. violaceoruber</i>	100.00	抑制革兰氏阳性菌、阴性菌
HB13 [#]	—	11	—	<i>S. sannanensis</i>	99.328	未见活性报道
HB14 [●]	—	—	—	<i>S. toxytricini</i>	99.925	抑制金黄色葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌、白色假丝酵母、颗粒青霉
HB21 [●]	—	—	—	<i>S. flavotricini</i>	100.00	强烈抑制革兰氏阳性菌、阴性菌、酵母菌和丝状真菌
HC5	—	—	—	<i>S. ciscaucasicus</i>	100.000	未见报道
HC7 [●]	—	—	—	<i>S. atrovirens</i>	98.140	抑制革兰氏阳性菌
HC9 [#]	—	22	—	<i>S. coerulescens</i>	99.925	抑制小球藻
HC10	—	—	—	<i>S. violaceochromogenes</i>	100.00	抑制革兰氏阳性菌和大肠杆菌
HC12	—	20	—	<i>S. flavotricini</i>	98.883	强烈抑制革兰氏阳性菌、阴性菌、酵母菌和丝状真菌

续表

菌株名称 Strain name	分离菌株的抑菌活性*			同源近似种 Homologous species	相似率/% Similarity rate	同源种的生物活性*
	Antagonism activity of isolates					
	Es [△]	St	Fu			
HC13 [●]	—	—	—	<i>S.collinus</i>	99.925	产生抑制革兰氏阳性菌的覆盖霉素 (Collinomycin)
HR10	13	24	—	<i>S.venezuelae</i>	100.000	多种活性, 产生氯霉素 (Chloramphenicol)、核酸霉素 (Rinamycin)、去氧核酸霉素 (Derinamycin)、双氢苦霉素 (Dihydropicromycin) 和莱马杀菌素 (Lemacidin)
HR13 [●]	—	—	—	<i>S.violaceoruber</i>	100.000	抑制革兰氏阳性菌、阴性菌
HS1	—	—	—	<i>S.violaceorubidus</i>	99.851	未见报道
HS5	—	16	—	<i>S.pilosus</i>	100.00	具有拮抗作用
YH2	—	18	—	<i>S.cyaneofuscatus</i>	99.225	抑制革兰氏阳性细菌
YH6	27	17	—	<i>S.griseoplanus</i>	99.857	抑制革兰氏阳性\阴性细菌和肉瘤, 产生新碱性抗生素 SF-1739
YH17	—	17	—	<i>S.lateritius</i>	98.967	强抑制革兰氏阳性细菌
YH21 [#]	27	32	—	<i>S.hyderabadensis</i>	99.033	未见活性报道
YH23	17	29	—	<i>S.afghaniensis</i>	99.364	产生抑制革兰氏阳性菌的泰东霉素 (Taitomycin)
YH37 [#]	12	21	—	<i>N.flavescens</i>	100.00	未见活性报道
YH66 [#]	—	11	—	<i>S.phaeogriseichromatogenes</i>	97.994	未见活性报道
YH58	—	14	—	<i>S.resistomycificus</i>	99.152	产生抑制革兰氏阳性细菌、分枝杆菌的拒霉素 (Resistomycin)
YH68	17	11	—	<i>S.rimosus</i>	99.820	广谱活性, 产生土霉素 (Oxytetracycline)、龟裂杀菌素 (Rimocidin)、巴龙霉素 (Paramomycin)、中性霉素 (Neytramycin)、抗生素 K-16
YH73	10	—	—	<i>S.griseourantiacus</i>	99.489	抑制革兰氏阳性菌、分枝杆菌和德巴利氏酵母
YH80	—	12	—	<i>S.coerulescens</i>	99.864	抑制小球藻
YH91	—	9	—	<i>S.diastaticus</i>	99.142	拮抗性有限, 轻度抑制芽孢杆菌
M53	—	10	—	<i>S.finlayi</i>	99.855	对藤黄八叠球菌和某些放线菌有效
M8 [#]	11	13	—	<i>S.bacillaris</i>	98.947	未见活性报道
M10	11	16	—	<i>S.violascens</i>	99.146	对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌十分微弱且不稳定的活性
M71	—	9	—	<i>S.ramulosus</i>	99.680	产生醋霉素 (Acetomycin), 抑制革兰氏阳性菌、阴性菌、毛滴虫和阿米巴
M76	10	23	—	<i>S.arenae</i>	97.863	抑制结核杆菌
M77 [#]	17	11	—	<i>S.radiopugnans</i>	98.892	未见活性报道
M95 [#]	—	8	8	<i>S.specialis</i>	99.155	未见活性报道
M105	—	12	—	<i>S.vinaceusdrappus</i>	99.272	产生友霉素 (Amicetin), 抑制革兰氏阳性菌、分枝杆菌
M107	—	7	—	<i>S.griseosporus</i>	99.174	产生泰东霉素, 抑制革兰氏阳性菌
M108	—	16	8	<i>S.laurentii</i>	98.856	产生硫链菌素 (Thiostrepton), 抑制革兰氏阳性菌、分枝杆菌
M109	16	7	—	<i>S.luteogriseus</i>	99.928	产生对 HeLa 细胞有毒性的佩里霉素 (Peliomycin), 有报道对革兰氏阳性菌有作用
MH6	17	34	—	<i>S.lydicus</i>	99.568	产生利迪链菌素 (Streptolydigin), 抑制革兰氏阳性、阴性、真菌、滴虫和抗真菌的利迪霉素 (Lydimycin)
MH28	—	—	—	<i>N.dassonvillei</i>	97.445	未见活性报道
GH1	—	13	—	<i>S.turgidiscabies</i>	99.331	引起植物病害
GH27 [#]	—	10	—	<i>S.haliclonae</i>	99.398	未见活性报道
GH31	—	16	—	<i>S.capillspiralis</i>	97.366	产生头孢菌素 C-4
GH68	—	8	—	<i>S.bellus</i>	99.378	产生抗革兰氏阳性菌的马塔霉素 (Matamycin)
GH69	—	—	—	<i>S.asterosporus</i>	98.796	未见活性报道

续表

菌株名称 Strain name	分离菌株的抑菌活性* Antagonism activity of isolates			同源近似种 Homologous species	相似率/% Similarity rate	同源种的生物活性* Bioactivity of homologous species
	Es [△]	St	Fu			
GH71	—	17	—	<i>S.rochei</i>	99.481	拮抗作用广泛,产生疏螺菌素(Borrelidin)、抗生素 T-2636、束菌素(Bundin)、兰卡杀菌素(Lankacidin)
GH72	—	9	—	<i>S.scabiei</i>	98.575	引起植物病害
GH74 [●]	—	—	—	<i>S.lincolnensis</i>	97.837	抑制革兰氏阳性、阴性细菌,产生林肯霉素(Lincomycin)、郎西纳霉素(Rancinamycins)
PH6 [#]	11	25	—	<i>S.radiopugnans</i>	98.822	未见活性报道
PH26 [#]	16	—	—	<i>N.dassonvillei</i>	97.516	未见活性报道
PH33	22	28	—	<i>S.parvus</i>	97.486	产生抗革兰氏阳性细菌和肿瘤的放线菌素(Actinomycin)
PH34	—	16	—	<i>S.ambofaciens</i>	97.937	抑制革兰氏阳性、阴性细菌、原虫、真菌和肿瘤,产生螺旋霉素(Spiramycin)、刚果杀锥虫素(Congocidin)、纺锤菌素(Netropsin)、偶氮霉素(Duazomycin)和偶氮亮氨酸(DON)
RH26	—	26	—	<i>S.anulatus</i>	99.711	抑制革兰氏阳性、阴性细菌和真菌
HV3 [#]	11	13	—	<i>N.terrae</i>	98.552	未见活性报道
HV14 [#]	11	10	9	<i>N.dassonvillei</i>	98.657	未见活性报道
HW3 [#]	—	12	—	<i>S.neopeptinius</i>	99.182	未见活性报道
HW6	—	14	—	<i>S.griseorubens</i>	99.634	抑制革兰氏阳性细菌和颗粒青霉,对阴性细菌和白色假丝酵母无作用
HW8	—	17	—	<i>S.tauricus</i>	98.804	对革兰氏阳性细菌微弱作用,在菌丝体内产生抑制肿瘤的公牛菌素(Tavromycin)
HW9	—	10	—	<i>S.violaceolatus</i>	100.00	对部分链霉菌微弱作用
HW16	—	13	—	<i>S.cuspidosporus</i>	98.254	产生抑制革兰氏阳性、阴性细菌以及肿瘤的稀疏菌素(Spansomycin)和抑制分枝杆菌的杀结核菌素(Tubercidin)
HW17	—	13	—	<i>S.cinereorectus</i>	99.927	抑制革兰氏阳性和阴性细菌
HW27	—	10	—	<i>S.fimicarius</i>	98.341	具有拮抗活性
HW45 [#]	13	11	—	<i>S.heliomycini</i>	99.703	未见活性报道
HW47 [#]	—	10	—	<i>N.dassonvillei</i>	99.641	未见活性报道
HW66	—	16	—	<i>S.pluricologrescens</i>	98.287	产生抑制革兰氏阳性细菌的色硫霉素(Chrothiomycin)和抑制肿瘤的多色霉素(Pluramycin)
HW72	—	11	—	<i>S.rubiginosohelvolus</i>	99.139	抑制革兰氏阳性细菌和颗粒青霉
HW83	—	11	—	<i>S.lusitanus</i>	99.298	产生四环素(Tetracycline)和金霉素(Chlorotetracycline),抑制革兰氏阳性、阴性细菌、分枝杆菌和大型病毒
HW85	—	13	—	<i>S.regensis</i>	100.00	产生放线菌素(Actinomycin),抑制革兰氏阳性细菌和肿瘤
HW87 [#]	17	17	—	<i>S.marinus</i>	99.104	未见活性报道
HL9	—	11	12	<i>S.fradiae</i>	97.474	广泛抗菌活性,产生新霉素(Neomycin)、弗氏菌素(Fradicin)、泰乐菌素(Tylosin)、大环内酯类抗生素 B-61269A、B-587 和氨基苷菌素(Aminosidine)
HE9 [#]	—	8	—	<i>N.aegyptia</i>	98.028	未见活性报道
HE11	13	13	—	<i>S.cellulosae</i>	98.867	产生抑制真菌、酵母菌的制霉色基素(Fungichromin)和制霉色质素(Fungichromatin)和放线菌素(Actinomycin)
HE16	9	16	9	<i>S.atrovirens</i>	98.821	抑制革兰氏阳性细菌
HE18 [#]	—	11	—	<i>S.coelicoflavus</i>	97.945	产生淀粉酶抑制剂

续表

菌株名称 Strain name	分离菌株的抑菌活性* Antagonism activity of isolates			同源近似种 Homologous species	相似率/% Similarity rate	同源种的生物活性* Bioactivity of homologous species
	Es [△]	St	Fu			
HE23	—	12	—	<i>S. rishiriensis</i>	99.129	产生香豆霉素 (Coumermycin)、新核苷抗生素 AT-265、枝三烯菌素 (Mycotrienins), 对革兰氏阳性、阴性细菌、真菌、酵母菌均有抑制作用, 对肿瘤作用微弱
HE34 [●]	11	—	—	<i>S. pristinaespiralis</i>	98.961	产生抑制革兰氏阳性细菌的原始霉素 (Pristinamycins)
HE55	—	8	—	<i>S. cinereorectus</i>	98.922	具有抑制革兰氏阳性和阴性细菌活性
HE65	—	10	—	<i>S. pactum</i>	98.433	广谱抗菌活性, 产生抗肿瘤抗生素密旋霉素 (Pactamycin)、密旋菌素 (Pactacin) 和杀虫的杀粉蝶菌素 (Piericidin)
HE66 [#]	—	12	10	<i>S. thermocarboxydus</i>	99.561	未见活性报道
HE67	—	9	—	<i>S. somaliensis</i>	99.031	寄生菌, 引起足菌病
HE68 [#]	—	18	—	<i>S. carpaticus</i>	99.564	未见活性报道
HE69	9	—	—	<i>S. avermitilis</i>	99.600	产生除虫菌素复合体, 杀线虫活性
HE71 [●]	13	14	—	<i>S. xantholiticus</i>	99.869	抗革兰氏阳性细菌、分枝杆菌、酵母菌和丝状真菌
SC2 [#]	16	17	—	<i>S. bacillaris</i>	99.383	未见活性报道
SC3 [#]	—	12	—	<i>S. carpinensis</i>	99.284	未见活性报道
SC12	14	24	—	<i>S. fradiae</i>	99.905	广泛抗菌活性, 产生新霉素 (Neomycin)、弗氏菌素 (Fradicin)、泰乐菌素 (Tylosin)、大环内酯类抗生素 B-61269A、B-587 和氨基苷菌素 (Aminosidine)
MA2	—	10	—	<i>S. tateyamensis</i>	99.033	强抑制革兰氏阳性细菌, 产生硫肽菌素 (Thiopeptins)
MA3	—	7	—	<i>S. corchorusii</i>	99.368	抑制真菌、革兰氏阳性细菌, 产生盐屋霉素 (Siomycin)

表中数据为 3 次重复实验, 抑菌圈直径平均值; — 表示没有抑菌活性; * 同源种的生物活性由 SciFinder 物质数据库查询, 网址: <http://scifinder.cas.org/>; # 分离菌株具有抑菌活性, 而其同源近似种未见活性报道的菌株; ● 近似同源种报道具有生物活性, 而分离菌株未检测出相应活性的菌株; △ Es 表示各菌株对大肠杆菌 (*E. coli*) 的抑菌活性; St 表示各菌株对金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*) 的抑菌活性; Fu 表示对尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum* F sp. *cucumarinum*) 的抑菌活性

2.5 同种海洋链霉菌与土壤链霉菌活性比较

由表 3 可见, 9 个种分别来源于土壤和海洋链霉菌的 24 株菌株中, 其抗菌活性表现差异较大。来自海洋的链霉菌除菌株 HR13 外, 均对金黄色葡萄球菌表现抗菌活性, 分别分属链霉菌的 9 个种。而来自土壤的链霉菌则只有 4 株分属链霉菌的 3 个种。表现抗真菌活性的 6 株链霉菌均来自土壤样品, 分属 4 个种。对大肠杆菌具有抑菌活性的 12 株链霉菌中, 10 株来自土壤, 来自海洋样品的仅有 2 株, 其中, 土壤源占 6 个种, 海洋源占 2 个种。研究结果进一步表明, 海洋源链霉菌更多地表现为抗革兰氏阳性菌活性, 土壤源链霉菌更多地表现抗真菌活性。同时, 研究也表明, 利用海水培养的与不利用海水培养的土壤链霉菌其活性没有差异。

3 结论与讨论

3.1 海洋放线菌的活性

Pisano 等^[11] 对海洋沉积物放线菌抗菌活性进行

研究时发现, 尽管拮抗放线菌的比例有的低至 15.8%, 有的高至 73%, 但均表现为主要抑制革兰氏阳性细菌, 其次是真菌, 对革兰氏阴性细菌的拮抗最小。Sujatha 从南印度 Tuticorin 海岸沉积物样品中分离的 64 株链霉菌中, 44 株链霉菌表现抗细菌活性, 占分离到的链霉菌株数的 68.8%^[12]。Zhang 等对黄海海洋沉积物中 24 株需要海水才能生长很好的放线菌活性时发现, 其中 17 株均具有抗细菌活性^[13]。在本实验中, 具有拮抗活性的菌株共有 95 株, 占总分菌数的 57.6%。其中抑制革兰氏阳性细菌的比例最高, 占总分菌比例的 51.5%, 其次为革兰氏阴性细菌, 占总分菌比例的 16.4%, 对真菌的抑制比例很小, 只有 3.6%, 且活性也很低。本研究结果与 Pisano 的研究结果相似, 即海洋链霉菌更多地表现抗革兰氏阳性细菌活性, 且活性远远高于相应的土壤链霉菌。而对真菌和革兰氏阴性细菌的活性均较低, 尤其对真菌活性, 其数量及活性大小均远远低于土壤链霉菌。由于许多革兰氏阳性细菌多分布于海洋沉

积物和海洋生物共生系统中,本研究分离获得的 165 株链霉菌中均来自渤海和黄海海域-20—40 m 水下海洋沉积物样品,50% 以上的菌株表现抗革兰氏阳性细菌活性,可能与样品中存在大量革兰氏阳性菌有关^[14]。是否这些革兰氏阳性菌株与海洋放线菌在营养或空间分布上存在竞争,而促使海洋放线

菌进化为更多的表现抗革兰氏阳性活性还有待进一步研究。但本文的研究结果,对于研究者更好地理解微生物多样性,科学解释微生物种群间的关系,利用共培养技术提高微生物次级代谢产物的产量,发现新型活性代谢产物以借鉴。

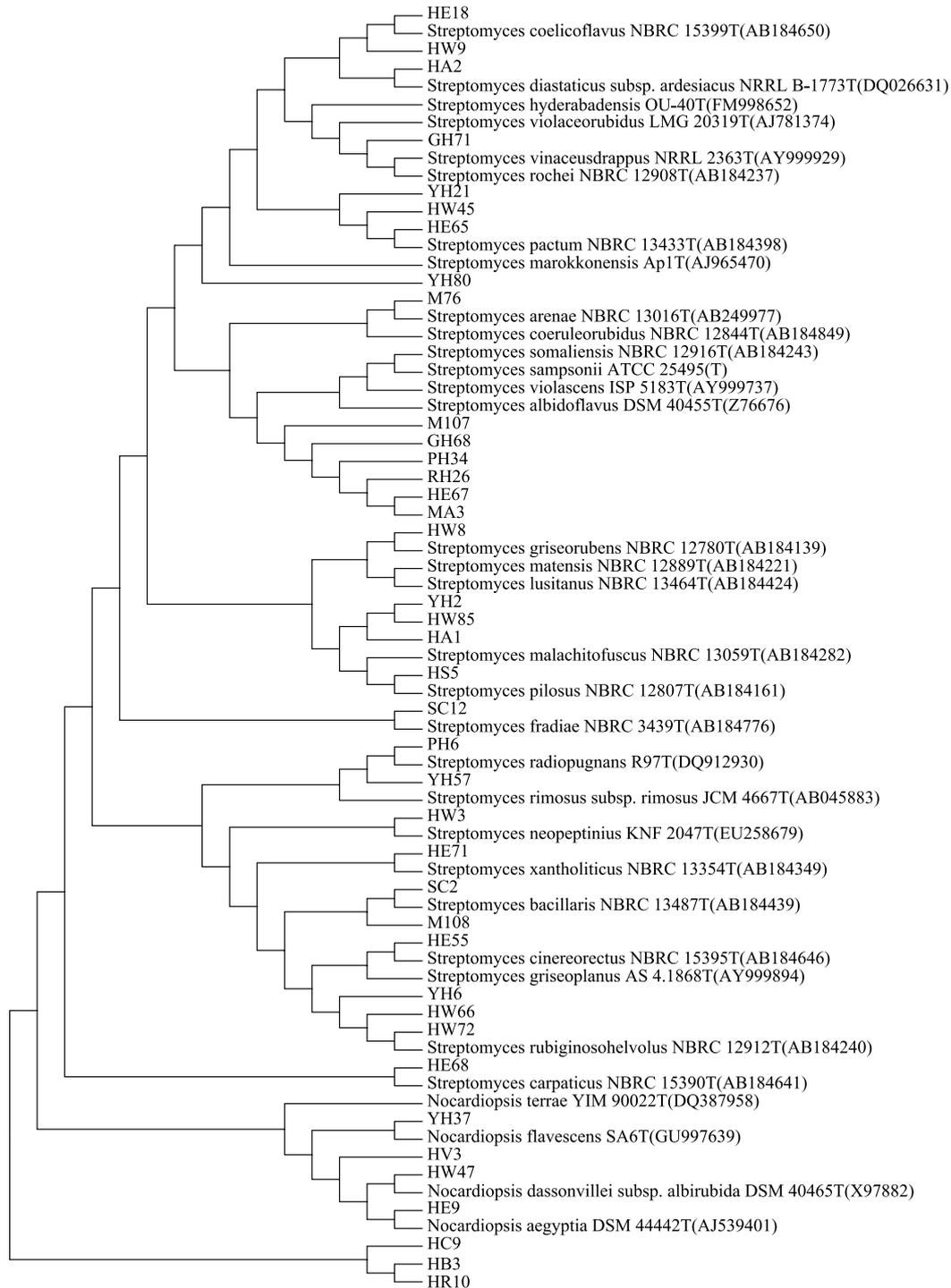


图 4 拮抗金黄色葡萄球菌的放线菌多样性分析

Fig.4 Species diversity analysis of antagonistic marine actinomyces against *S.aureus*

表 3 土壤放线菌和海洋放线菌对不同病菌的活性比较

Table 3 Activity comparison of actinomycetes from soil and marine against pathogens

菌株名称 Strain name	菌株编号 Strain number	抑菌活性 Antagonism activity/mm			来源 Sources
		黄瓜枯萎病菌	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	
浅天蓝链霉菌 <i>S.coerulescens</i>	YH80	—	—	12	海洋
	LQ137	—	11	—	温室土壤
	LQ1	—	9	—	温室土壤
粪生链霉菌 <i>S.fimicarius</i>	HW27	—	—	10	海洋
	M5	—	—	—	大田土壤
毛链霉菌 <i>S.pilosus</i>	HS5	—	—	16	海洋
	V6	—	13	—	大田土壤
紫阔链霉菌 <i>S.violaceolatus</i>	HW9	—	—	10	海洋
	K1	—	12	—	大田土壤
	HR13	—	—	—	海洋
	LQ69	—	9	—	温室土壤
	R11	—	—	16	大田土壤
淀粉酶链霉菌 <i>S.diastaticus</i>	HA2	—	—	39	海洋
	LQ37	13	14	12	温室土壤
	高 30	16	15	13	大田土壤
龟裂链霉菌 <i>S.rimosus</i>	YH68	—	17	11	海洋
	高 F-9	26	18	—	大田土壤
葡萄牙链霉菌 <i>S.lusitanus</i>	HW85	—	—	13	海洋
	LQ123	—	11	—	温室土壤
深红紫链霉菌 <i>S.violaceorubidus</i>	HS1	—	—	—	海洋
	M3	11	10	—	大田土壤
弗氏链霉菌 <i>S.fradiae</i>	SC12	—	14	24	海洋
	HL9	13	—	11	海洋
	H86	12	—	8	大田土壤

表中数据为 3 次重复实验,抑菌圈直径平均值;—:表示没有抑菌活性

95 株分离菌株中具有抑菌活性,而其同源近似种未见活性报道的有 23 株。这一结果说明,在海洋链霉菌中可能存在着大量的新型活性物质。近似同源种报道具有生物活性,而分离菌株未检测出相应活性的菌株有 13 株。同时,相应近似种报道具有抑制革兰氏阴性菌活性,而其对应的分离菌株则未检出相应活性。究其原因,可能是由于微生物在不同的环境条件下通过不同途径代谢不同的活性代谢产物。有关同种海洋链霉菌与土壤链霉菌活性比较结果也进一步表明,即使同一种链霉菌,由于其栖境不同,其活性也存在很大差异。同时,9 个种土壤和海洋链霉菌的 24 株菌的活性比较也再次证明海洋链霉菌多表现抗革兰氏阳性菌活性。

3.2 活性海洋放线菌的系统发育地位

链霉菌属的种群异常繁多,阎逊初先生根据国内外大量的分类鉴定资料和多年的实践经验,将链霉菌分为 12 个类群^[15],本研究筛选的 95 株活性海

洋放线菌涵盖除吸水类群外的所有链霉菌类群,且多表现广谱抗性。在 27 株表现阴性菌的活性菌株中 23 株同时表现抗革兰氏阳性菌,6 株抗尖孢镰刀菌活性的菌株也同时抗革兰氏阳性菌,据结论可推测抗革兰氏阳性菌的活性海洋放线菌菌株表现更为广谱的抗菌活性,具备产生广谱性代谢产物的潜能,进一步说明海洋链霉菌是获得新型广谱性活性代谢产物的重要资源。

95 株分离菌株中具有抑菌活性,而其同源近似种未见活性报道的 23 株分离菌株,对目标菌株均将作为新型活性化合物筛选的潜在菌株。同时,即使分离菌株的生物活性与近似同源种报道的生物活性相近,具体分析其活性也有一定的差异。如根据筛选菌株的亲缘关系分析,如图 3 和表 3 中 M10 与 *S.violascens* 亲缘关系最近(同源性 99.146%),*S.violascens* 的文献资料表明其对大肠杆菌有十分微弱且不稳定的活性^[15],但菌株 M10 的对革兰氏阳性

和阴性菌株的抑菌活性都很稳定,3次重复实验结果均表现抑菌活性。同样,菌株 HA2 与 *S.diastaticus* 亲缘关系最近(100%同源性),但相关文献报道该链霉菌拮抗活性有限,只有轻度抑制枯草芽孢杆菌的活性,并未发现抑制金黄色葡萄球菌的活性^[15-16],而菌株 HA2 对金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径高达 39.0 mm,且活性稳定。因此,有待于对这些菌株的活性代谢产物进行进一步的研究。

References:

- [1] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1-26.
- [2] Bull A T, Stach J E M, Ward A C, Goodfellow M. Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, 87(1): 65-79.
- [3] Mincer T J, Jensen P R, Kauffman C A, Fenical W. Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 5005-5011.
- [4] Tian X P, Zhang S, Li W J. Advance in marine actinobacterial research-A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(2): 161-169.
- [5] Lam K S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 2006, 9(3): 245-251.
- [6] Zhang H T, Lee Y K, Zhang W, Lee H K. Culturable actinobacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perleve*: isolation and phylogenetic diversity by 16S rRNA gene-RFLP analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 90(2): 159-169.
- [7] Lin L, Tan Y, Chen F F, Zhou H X, Wang Y G, He W Q, Wang Y. Diversity of culturable actinomycetes in Sea deposit of Tiger beach at Bohai bay, Dalian, China. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(2): 262-269.
- [8] He J, Zhang D F, Xu Y, Zhang X M, Tang S K, Xu L H, Li W J. Diversity and bioactivities of culturable marine actinobacteria isolated from mangrove sediment in Indian Ocean. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(10): 1195-1202.
- [9] Xu P, Li W J, Xu L H, Jiang C L. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes. *Microbiology*, 2003, 30(4): 82-84.
- [10] Zhao B X, Gao Z G, Shao Y, Yan J F, Hu Y C, Yu J C, Liu Q, Chen F. Diversity analysis of type I ketosynthase in rhizosphere soil of cucumber. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 52(2): 224-231.
- [11] Pisano M A, Sommer M J, Taras L. Bioactivity of chitinolytic actinomycetes of marine origin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1992, 36(4): 553-555.
- [12] Selvakumar D. Marine Streptomyces as a novel source of bioactive substances. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2010, 26(12): 2123-2139.
- [13] Zhang S M, Ye L, TANG X X, Diversity and Bioactivity of Actinomycetes from Marine Sediments of the Yellow Sea. *Journal of Ocean University of China (Oceanic and Coastal Sea Research)*, 2012, 11(1): 59-64.
- [14] Lin B X, Huang Z Q, Xie L H. Advance in researches of drugs derived from marine bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(4): 657-660.
- [15] Yan X C. Classification and Identification of Actinomycetes. Beijing: Science Press, 1992: 296-299, 473, 961.
- [16] Seco E M, Cuesta T, Fotso S, Laatsch H, Malpartida F. Two polyene amides produced by genetically modified *Streptomyces diastaticus* var. 108. *Chemistry & Biology*, 2005, 12(5): 535-543.

参考文献:

- [5] 田新朋, 张懿, 李文均. 海洋放线菌研究进展. *微生物学报*, 2011, 51(2): 161-169.
- [7] 林灵, 谭亿, 陈菲菲, 周红霞, 王以光, 赫卫清, 王勇. 大连渤海老虎滩海域沉积物可培养放线菌的多样性. *微生物学报*, 2011, 51(2): 262-269.
- [8] 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.
- [9] 徐平, 李文均, 徐丽华, 姜成林. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, 30(4): 82-84.
- [12] 林白雪, 黄志强, 谢联辉. 海洋细菌活性物质的研究进展. *微生物学报*, 2005, 45(4): 657-660.
- [13] 阎逸初. 放线菌的分类与鉴定. 北京: 科学出版社, 1992: 296-299, 473, 961.