

拮抗放线菌 Y-71 的鉴定及其代谢活性物质的性质

叶海霞^{1,2} 郭春晓¹ 丁祥¹ 罗强¹ 杨志荣^{1,2*}

(1. 四川大学生命科学学院 四川 成都 610064)

(2. 四川大学生物资源与生态环境教育部重点实验室 四川 成都 610064)

摘要: 本研究从云南采集的腐质土壤样品中分离筛选到一株拮抗放线菌 Y-71, 通过形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞化学组分和基于 16S rRNA 基因序列的相似性分析等研究, 鉴定菌株 Y-71 为脱叶链霉菌(*Streptomyces exfoliatus*)。抗菌谱测定及稳定性研究结果表明, 菌株 Y-71 发酵液抑菌谱较广, 对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌都有较好的抑制作用; 其抑菌活性物质对温度敏感, 在 70°C 处理后抑菌活性丧失; 在 pH 2–8 条件下稳定; 不能被蛋白酶降解, 可初步判定此活性物质不属于蛋白质或肽类物质。本研究为该菌株今后的应用、抗生素的分离提纯奠定了基础。

关键词: 脱叶链霉菌, 鉴定, 抗菌活性, 稳定性

Identification of an Actinomycetes Y-71 and Its Metabolic Substances' Property

YE Hai-Xia^{1,2} GUO Chun-Xiao¹ DING Xiang¹ LUO Qiang¹ YANG Zhi-Rong^{1,2*}

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

(2. Key Laboratory of Bio-resource and Eco-environment, Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

Abstract: An antimicrobial actinomycete, labelled Y-71, was selected from the putrilage soil collected from Yunnan, China. We identified it *Streptomyces exfoliatus*, by light microscope and SEM observation, physiological and biochemical characterization, cellwall components analysis and 16S rRNA sequence alignment. Its fermentation liquor had wide antimicrobial spectrum, effectively against the Gram-positive and Gram-negative bacteria. The antimicrobial substance was sensitive to high temperature and the 70°C condition could deprive its antimicrobial activity thoroughly. However, it was rather stable under the 2–8 pH value, and couldn't be degraded by proteases. Based on these results, we proposed that its antimicrobial substances may not be proteins or peptides. Our research revealed the basic features of strain Y-71 and may help a lot to its further study and application, such as the isolation and purification of antibiotics.

Keywords: *Streptomyces exfoliatus*, Identification, Antimicrobial activities, Stability

放线菌是一类具有重要实用价值和经济价值的微生物,在土壤中丰度高,种类繁多,是生产抗生素、维生素、酶抑制剂、抗寄生虫剂和免疫调节剂等多种生物活性物质的主要产生菌,为人类的健康以及生产生活作出巨大贡献。目前,已知的抗生素大约有80%来自于放线菌,其产生的抗生素具有抗肿瘤、抗真菌、抗细菌、抗寄生虫等多种活性^[1],如 Hoshino 研究报道从菌株 *Nocardia transvalensis* IFM 10065 中分离得到抗生素 Transvalencin A 对某些真菌具有抑制活性^[2];海洋马杜拉放线菌 M048 菌株产生的抗生素 Chandrananimycins A-C 都具有抗结肠癌、黑瘤、肺癌、乳腺癌等肿瘤细胞的活性^[3],等等。

近年来,人们不断滥用广谱抗生素,导致微生物耐药性的不断产生,加上细菌、真菌感染机率的上升,以及有害微生物突变种的不断产生,使得人们对新抗生素的筛选极其迫切^[4]。目前,人们分离到的放线菌仅占土壤中所有放线菌的 1%–10%^[5]。因而,利用土壤放线菌寻找新的抗生素具有广阔的前景。

本研究对采自云南腐质土壤样品进行拮抗放线菌的筛选,获得一株具有较强抑菌活性的编号为 Y-71 的菌株。通过对所获菌株进行形态特征、培养特征、生理生化、细胞化学组分分析及 16S rRNA 序列测定,确定了其分类地位;同时对 Y-71 菌株发酵液的抑菌谱、稳定性等特性进行了初步研究,为获得新的抗生素提供了实验基础及其理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 参照肖静^[6]等的方法从云南腐质土壤样品中分离纯化得到编号为 Y-71 菌株。供试菌株见表 4。

1.1.2 培养基: 用高氏 1 号培养基进行菌种形态观察,用淀粉琼脂、蔗糖察氏琼脂、葡萄糖天门冬素琼脂、马铃薯块等进行菌种鉴定,参照文献^[7]制备。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 形态特征: 采用平皿插片法^[8]。将菌株 Y-71 接种于高氏 1 号琼脂固体培养基上,28℃ 培养 14 d,取插片用光学显微镜和扫描电镜进行菌株形态观察。

1.2.2 培养特征: 参照《放线菌的分类和鉴定》和《链霉菌鉴定手册》中的方法。在上述 5 种培养基中,28℃ 下培养 7–10 d,观察菌丝体的颜色及可溶

性色素。

1.2.3 生理生化特征: 参照《放线菌的分类和鉴定》和《链霉菌鉴定手册》中的方法观察菌株 Y-71 生理生化特性。测定纤维素水解、淀粉水解、明胶液化、产硫化氢、牛奶凝固和胨化及产酪氨酸酶的情况。

1.2.4 细胞壁化学组分分析: 菌株 Y-71 细胞壁化学组分分析参照王平^[9]的方法。

1.2.5 16S rRNA 的 PCR 扩增及其系统发育分析: 先提取菌体总 DNA^[10],PCR 扩增选用通用引物 27F 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3', 1504R 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。反应体系 50 μL: 25 μL 2 × Taq Mix 混合物,各 2 μL 正反引物,10 μL 5 × Buffer Q,4 μL DNA 模板,7 μL ddH₂O。PCR 反应按下述程序进行扩增: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 53℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 5 min。回收纯化后的目的片段,由 Invitrogen 英骏(上海)贸易有限公司完成测序。将所测的 16S rRNA 序列采用 MEGA 3.0 等软件对菌株进行系统发育分析,采用邻接法(Neighbour-joining, NJ 法)构建系统进化树。

1.3 Y-71 菌株代谢产物的抗菌谱测定

采用管碟法^[11],将供试菌株与适量培养基充分混匀,倒入培养皿中制成混菌平板,放上牛津杯,加入由菌株 Y-71 发酵,经离心(10000 r/min, 10 min)所得的上清液,即发酵原液 0.2 mL,重复 3 次,以无菌水为对照,于 28℃ 恒温培养 24 h,以抑菌圈直径为指标测定其抑菌活性。

1.4 Y-71 菌株代谢产物的稳定性测定^[12]

以金黄色葡萄球菌为指示菌,以无菌水和发酵原液为对照,采用“十”字交叉法测量抑菌圈直径,测定发酵液在不同条件下处理后的抑菌活性,根据抑菌活性的变化情况确定其稳定性。

1.4.1 热稳定性测定: 取发酵液 3 mL 放入 5 mL 的 EP 管内,分别在 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃ 和 100℃ 温度下处理 30 min,每个温度重复 3 次。

1.4.2 酸碱稳定性测定: 将发酵液用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 分别调整 pH 值至 3、4、5、6、7、8、9、10,静置 12 h,再分别将各发酵液的 pH 值慢慢调至原发酵液初始 pH 值(6.5),每个 pH 重复 3 次。

1.4.3 蛋白酶稳定性测定: 取发酵液 6 mL 放入 10 mL 的 EP 管内,分别用蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶(15 g/L)在 37℃ 下处理 60 min,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态学特征: 在高氏 1 号固体培养基上 Y-71 菌株的菌落呈白色, 凸起, 有褶皱, 表面干燥且光滑。基内菌丝无色或浅褐色, 气生菌丝黄白或灰白色, 无可溶性色素。由图 1 可知, 孢子丝非轮生, 柔曲或直, 孢子圆柱形或卵圆形, 表面光滑。按照形态特征初步判定菌株 Y-71 属于链霉菌属。

2.1.2 培养特征: 从表 1 可以看出, 菌株 Y-71 在多数培养基上均生长良好, 在蔗糖察氏和葡萄糖天门冬素琼脂培养基上中等生长; 在不同培养基上, 基内菌丝颜色米色至琥珀色, 气生菌丝白色至灰色; 所有供试培养基上均不产生可溶性色素。

2.1.3 生理生化指标测定: 由表 2 结果可知: 菌株 Y-71 能较好利用淀粉和醇; 中等利用 D-葡萄糖、D-棉子糖、麦芽糖、蔗糖和乳糖; 不利用 D-阿拉伯糖、D-果糖、D-木糖、鼠李糖、L-山梨糖等作唯一碳源。由表 3 结果可知, 该菌不利用纤维素; 水解淀粉能

力较弱; 明胶液化; 不产 H₂S; 不产酪氨酸酶; 牛奶既不凝固也不胨化。

2.1.4 细胞化学组分分析: 菌株 Y-71 全细胞水解产物中含 LL-DAP、甘氨酸, 细胞壁组型为 I。含葡萄糖、半乳糖、木糖和核糖等糖类, 不含特征性糖。这些结果与链霉菌属特征相符。

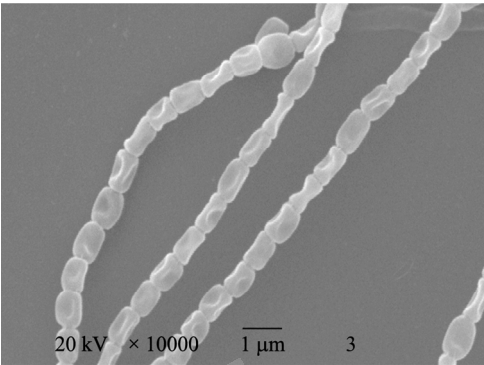


图 1 菌株 Y-71 在高氏 1 号固体培养基培养 14 d 的扫描电镜照片(× 10000)
Fig. 1 SEM of strain Y-71 grown on Gause's synthetic agar for 14 days (× 10000)

表 1 在不同培养基中的生长特征
Table 1 Characteristics of culture on different media

培养基 Medium	生长 Growth	基内菌丝颜色 Substrate mycelium color	气生菌丝颜色 Aerial mycelium color	色素 Pigment
Inorganic salt-starch agar	Abundant	Beige	Yellowish grey	—
Sucrose-czapek agar	Moderate	No	Yellowish white	—
Glucose-asparamide agar	Moderate	No	White	—
Potato block	Abundant	Amber	White	—
Gause's synthetic agar	Abundant	Amber	Greyish white	—

注: —: 不产生可溶性色素。
Note: —: Diffusible pigments were not produced.

表 2 碳源的利用
Table 2 Utilization of carbon sources

碳源 Carbon source	结果 Result	碳源 Carbon source	结果 Result
D-arabinose	—	Sucrose	+
D-fructose	—	Starch	+
D-glucose	+	Lactose	+
D-xylose	—	L-sorbose	—
Raffinose	+	Mannitol	+
Maltose	+	Myoinositol	+
Rhamnose	—		

注: +: 阳性; —: 阴性。
Note: +: Positive; —: Negative.

2.1.5 16S rRNA 的 PCR 扩增及其序列分析: 测得菌株 Y-71 的 16S rRNA 基因核酸序列全长 1395 bp。用 BLAST 序列比对工具在 GenBank 等数据库中进行序列相似性比对, 发现菌株 Y-71 与链霉菌属 (*Streptomyces*) 菌株高度相关, 说明该菌株可能是链霉菌属的成员。在用邻接法 (Neighbour-joining method) 构建的系统进化树上 (见图 2), 菌株 Y-71 与该属的脱叶链霉菌有极高的 16S rRNA 基因序列相似性 (Sequence similarity, 99.0%)。因此根据菌株 Y-71 的形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞化学分类特征和基于 16S rRNA 基因序列的相似性分析等研究, 初步鉴定菌株 Y-71 为脱叶链霉菌 (*Streptomyces exfoliatus*)。

表 3 生理生化特征			
Table 3 Physiological and biochemical characteristics			
理化特征	结果	理化特征	结果
Physiological and biochemical characteristics	Result	Physiological and biochemical characteristics	Result
Hydrolysis of cellulose	—	Milk solidification	—
Amylohydrolysis	+	Peptonization	—
Gelatin liquefaction	+	Monophenolase	—
Production of H ₂ S	—		

注: +: 阳性; -: 阴性.
Note: +: Positive; -: Negative.

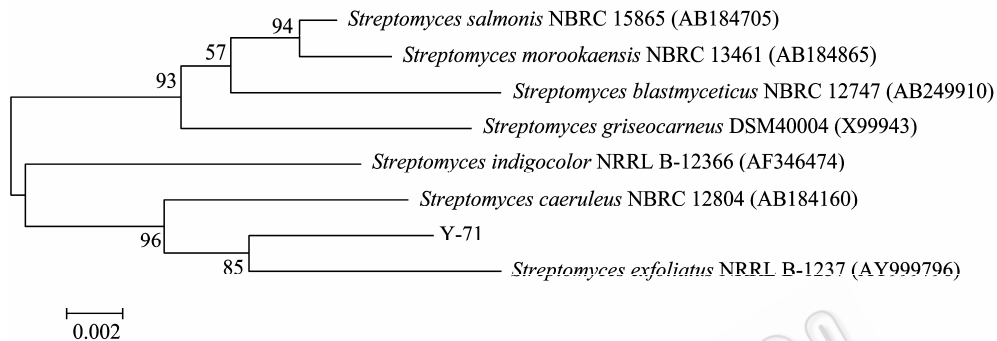


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 Y-71 的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic neighbour-joining tree based on the 16S rRNA gene sequences of strain Y-71 and related *Streptomyces* species

Note: The tree was evaluated by bootstrap analysis of the neighbour-joining method based on 1000 replications. The numbers on the tree indicate bootstrap values greater than 50%. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Bar: 0.002 sequence divergence.

2.2 发酵液活性物质研究

2.2.1 抗菌谱测定: 由表 4 可看出: 菌株 Y-71 发酵液对革兰氏阴性细菌中的大肠杆菌抑制作用最强, 抑菌圈直径为 26.5 mm, 对其余两种也有较强抑菌作用, 抑菌圈在 20 mm 以上; 对革兰氏阳性细菌中的枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌都有较强抑制作用, 抑菌圈直径分别为 22.2 mm 和 23.6 mm; 对真菌和酵母都没有抑制作用。表明菌株 Y-71 发酵液对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌都有较好的抑制作用, 其代谢产物具有较广的抑菌活性。

2.2.2 热稳定性: 由图 3 可知: 在 30℃ 到 60℃ 之间, 随着处理温度的升高, 发酵液的抑菌活性缓慢下降, 当温度达到 70℃ 时, 抑菌活性完全丧失, 说明菌株 Y-71 发酵液对热不稳定。

2.2.3 酸碱稳定性: 由图 4 可知: 菌株 Y-71 发酵液在酸性环境 and 中性环境下比较稳定, 经强碱处理后活性有所下降, 当 pH 值达到 9 时, 抑菌活性完全丧失。

2.2.4 蛋白酶稳定性: 由图 5 可知: 菌株 Y-71 发酵液采用蛋白酶 K (PK)、胰蛋白酶(Trypsin)和胃蛋白酶(Peosin)处理后, 与发酵原液相比其抑菌效果

表 4 菌株 Y-71 发酵液的抗菌谱	
Table 4 Antimicrobial activities of strain Y-71 fermentation broth	
指示菌	抑菌圈直径
Tested microorganisms	Diametre of inhibited zone (mm)
Gram-positive bacteria	
<i>Bacillus subtilis</i>	22.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	23.6
Gram-negative bacteria	
<i>Escherichia coli</i>	26.5
<i>Salmonella typhi</i>	20.4
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	21.2
Fungi	
<i>Candida albicans</i>	—
<i>Rhizoctonia solani</i>	—
<i>Fusarium graminearum</i>	—
<i>Bipolaris maydis</i>	—
<i>Aspergillus flavus</i>	—
<i>Aspergillus niger</i>	—
Yeast	
<i>Candida tropicalis</i>	—
<i>Bakers' yeast</i>	—

注: —: 无抑菌圈.
Note: —: No inhibition.

仍然明显。说明此活性物质不会被蛋白酶所降解,可初步断定发酵液中代谢产物不属于蛋白质或肽类物质。

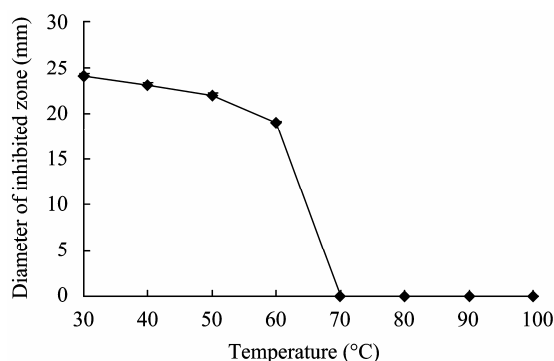


图3 温度对抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of temperature on antimicrobial activity

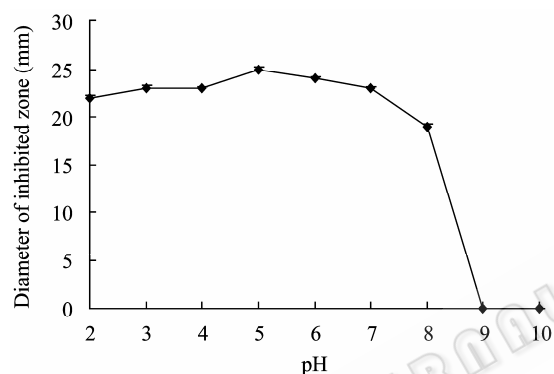


图4 pH对抑菌活性的影响

Fig. 4 Effect of pH on antimicrobial activity

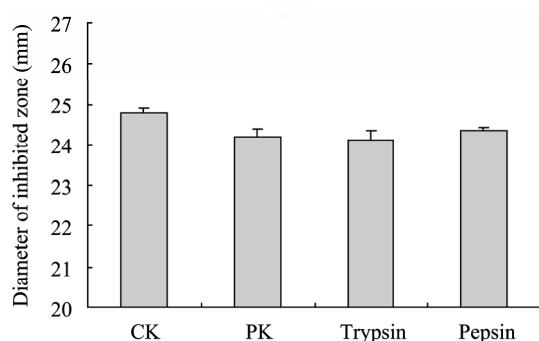


图5 蛋白酶对抑菌活性的影响

Fig. 5 Effect of proteases on antimicrobial activity

3 结论

本研究采用分类方法,结合分子生物学手段对筛选的活性菌株进行了分类鉴定。结合形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞壁化学组分以及

16S rRNA 基因序列分析等鉴定结果,菌株 Y-71 可归为脱叶链霉菌(*Streptomyces exfoliatus*),但此菌株与文献报道的脱叶链霉菌存在一些差异,如:报道的脱叶链霉菌不能利用醇作为碳源。但目前尚不能确定该菌株是否为一新种,还需要与典型菌株进行生理生化性质比较,并进行 DNA 杂交,根据同源性作进一步分析。

Kye Joon Lee 等报道脱叶链霉菌(*Streptomyces exfoliatus*) SMF19 产生 β 内酰胺类抗生素,且分离纯化得到 β 内酰胺酶抑制物,可以破坏病原菌的耐药性,保持 β 内酰胺类抗生素的活性。本实验对菌株 Y-71 发酵液抗菌谱及稳定性的研究表明:菌株 Y-71 发酵液对革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌都有较好的抑制作用,其抗菌谱较广,具有进一步开发研究的价值;对温度敏感;酸性和中性环境下活性稳定,碱性环境下不稳定;不能被蛋白酶降解,可初步判定此活性物质不属于蛋白质或肽类物质,其化合物的纯化与结果解析需进一步研究。

本研究不仅为从天然放线菌中寻找抗生素提供了新的菌株资源及实验基础,而且为菌株 Y-71 发酵液中活性物质的深入研究提供了有利实验依据,具有实际的指导意义。进一步的研究将集中在发酵产物中活性物质的分离纯化以及结构鉴定上,并对活性物质的抑菌机理进行探索。

参考文献

- [1] 姜怡,唐蜀昆,张玉琴,等.放线菌产生的生物活性物质.微生物学通报,2007,34(1):188-190.
- [2] Hoshino Y, Mukai A, Yazawa K. Transvalencin A, a thiazolidine zinc complex antibiotic produced by a clinical isolate of *Nocardia transvalensis* I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *Antibiot*, 2004, 57(12): 797-802.
- [3] Maskey RP, Li FC, Qin S. Chandrananimycins A-C: production of novel anticancer antibiotics from a marine *Actinomyces* sp. isolate M048 by variation of medium composition and growth conditions. *Antibiot*, 2003, 56(7): 622-629.
- [4] Boudemagh A, Kitouni M. Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale*, 2005(15): 39-44.
- [5] János Bérty. Bioactive Microbial Metabolites. *Antibiot*,

- 2005, **58**(1): 1–26.
- [6] 肖静, 许静, 谢庶洁, 等. 红树林放线菌的分离及其抗菌和抗肿瘤细胞活性. 应用与环境生物学报, 2008, **14**(2): 244–248.
- [7] 瓦克斯曼 SA 著, 阎逊初译. 放线菌属和种的分类、鉴定和描述. 第 2 卷. 北京: 科学出版社, 1974.
- [8] 沈萍, 范秀容, 李光武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社. 第 4 版. 2007: 72–73.
- [9] 王平. 微生物学通报, 1986, **13**(5): 228–231.
- [10] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 等. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法. 生物技术, 2007(17): 41–44.
- [11] 郑法新, 程璐, 李侠, 等. 云南红豆杉内生放线菌 TAR11 活性代谢产物的初步研究. 生物技术通讯, 2009, **20**(4): 538–540.
- [12] Ponce AG, Moreira MR, del Valle CE, *et al.* Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables. *LWT*, 2008(41): 432–441.

~~~~~  
(上接 p.1152)

## 征 稿 简 则

### 3.4 摘要写作注意事项

#### 3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网址上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

## 6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>